

ウイルス第二部

部長 脇田 隆 宇

概 要

当部が対応するウイルスは主として消化器系疾患の原因ウイルスであり、A、B型肝炎ワクチン、不活化ポリオワクチン、弱毒生ロタワクチンを検定、検査対象としている。

第1室は下痢症ウイルスを担当するとともに、ポリオワクチン、ロタワクチンの検定、検査を担当する。本年度はポリオ単独不活化ワクチン（サノフィ：イモバックスポリオ）の承認前試験が終了し、小分け製品37件の検定を行った。また、沈降精製百日せき破傷風不活化ポリオ（セービン株）混合ワクチンDPT-sIPV、2種類（一般財団法人阪大微生物病研究会：テトラビック皮下注シリンジ、一般財団法人化学及血清療法研究所：クワトロバック皮下注シリンジ）の承認前検査が終了し、中間段階3件、小分け製品10件の検定を行った。ロタウイルスワクチンのGSK：ロタリックスについては、2件の検定を行った。MSD：ロタテックに関しては、承認前試験が終了した。サノフィ社のポリオ単独ワクチンを第一三共社のDPTと混合した沈降精製百日せき破傷風不活化ポリオ混合ワクチンDPT-cIPV、サノフィ第一三共：スクエアキッズ皮下注シリンジの承認前検査が開始された。ワクチン導入前後のロタウイルスの流行状況を把握するための研究、ロタウイルスの基礎研究が進行している。

ノロウイルスに関しては、感染研はレファランスセンターとしての機能を良く果たしている。カリシウイルスに関する基礎研究が進展している。X線解析、クライオ電顕による構造解析に関する研究に加え、ノロウイルスが細胞に結合するメカニズムに関する研究進展があった。

第2室はWHO世界ポリオ根絶計画に参画している。WHOの指定をうけて、世界の特殊専門ラボとして、また西太平洋地域の指定ラボとして世界各地で分離されるポリオウイルスの性状解析を続けた。西太平洋地

域では2000年以来ポリオフリーを維持してきたが、2011年には中国の新疆ウイグル自治区で野生型ポリオの流行が確認された。流行は終息したが今後も注視していく必要がある。JICAとの共催で実施した第22回ポリオ実験室診断技術研修会（ポリオを含むワクチン予防可能疾患の世界的制御のための実験室診断技術研修としては第3回目）ではポリオ流行国など各国からの参加者に講義および実習を実施した。また、国内エンテロレファレンスセンターとしてレファレンス活動、行政検査をおこなった。

エンテロウイルス71は手足口病の原因ウイルスであり、脳炎を併発することがある。エンテロウイルス71の感染受容体、ヒトPSGL-1に関する解析を進めている。環境中のエンテロウイルスサーベイランスも進めている。

第3室及び第4室ではB型およびC型肝炎ウイルスの行政研究および基礎研究をおこなった。行政研究としては、肝炎ウイルス感染の予防、肝炎ウイルスキャリア対策、肝癌死亡の減少に貢献することを目的として、肝炎情報の収集とウイルス第二部のホームページにおいてデータベース構築および情報発信をおこなっている。さらに、肝炎ウイルス検査陽性者の予後向上は医療費抑制に大きく貢献できると期待できるので、全国レベルでの肝炎ウイルス検査陽性者追跡システムの構築を目指している。基礎研究促進を目的に、肝炎研究基盤整備事業で肝炎セミナーを5回開催した。さらに、12月には国内の肝炎ウイルス研究者による肝炎ウイルス研修会を開催し、若手研究者の育成に努めた。基礎研究としては、B型肝炎ウイルス研究が軌道にのり、ウイルス感染や複製増殖に関わる宿主因子などの同定が進んだ。C型肝炎ウイルス研究も様々な研究課題が展開されている。遺伝子型3のC型肝炎ウイルス複製系の構築と予防的ワクチン開発について報告した。

第5室の最重要課題はA型及びB型肝炎ワクチンの検定、検査である。本年度はA型肝炎ワクチン4件、B型肝炎ワクチン15件の検定をおこなった。ともに検定数は増加傾向にある。B型肝炎ワクチンの定期接種化も見据えて検定数のさらなる増加に備える必要がある。このために動物を用いた力価試験から試験管内力価試験への切り替えが望まれる。E型肝炎ウイルスの研究では感染性 cDNA クローンを樹立し報告した。また、ラットやフェレットのE型肝炎ウイルスの解析が進んだ。

以下のような国際的技術協力をおこなった。

第五室

楊 婷婷（中国、山東省青島市疾病予防控制中心）
＜日中笹川奨学金制度研究者＞平成24年9月6日～平成25年8月26日、E型肝炎分子生物学に関する研究。

人事面では、平成24年4月に片岡周子研究員が採用された。さらに平成24年9月に藤井克喜任期付研究員が研究員に採用された。新職員の皆さんの活躍に大いに期待する。

業績

調査・研究

I. 下痢症ウイルスに関する研究

1. ノロウイルス (NoV) に関する研究

(1) ノロウイルスリバーシジェネティクスシステムに関する研究

新生ウイルス粒子を産生可能なヒトノロウイルス GII/3 U201 株の完全長 cDNA pKS-U201F を用いたリバーシジェネティクスシステムを GII/4 Sagal strain, GII/4, 3 キメラウイルス株 TCH04-577 株, GI/1 Norwalk prototype virus に応用して構築したプラスミドを用い、ウイルスタンパク質の細胞内挙動を解析した。ヒトノロウイルスタンパク質の細胞内挙動は株間で類似しており、核周辺部に大きなドット様構造物を形成すること、細胞質全体にポリメラーゼ、プロテアーゼが検出されるなどの共通の特徴が認められた。

[片山和彦, 戸高玲子, 村上耕介, 脇田隆字]

(2) ノロウイルスを利用した経口ワクチン用ベクター作製の試み

経口ワクチンに特化した腸管特異的な導入が可能なベクターとしてヒトノロウイルスに加え、マウスノロウイルスを利用した遺伝子導入ベクターの作製を行った。pKS-U201F のヒトノロウイルス遺伝子領域をマウスノロウイルスと交換した pKSF-MuNoV-S7, マウスノロウイルスゲノム RNA を T7 RNA polymerase promoter で転写可能な pT7-MuNoV-S7 を構築した。インビトロで合成した MuNoV RNA は、RAW 細胞、293T 細胞の双方で感染性 MuNoV 粒子を産生可能であった。そこでプラスミドによるゲノム供給を可能とするよう、pKS-U201F を用いたリバーシジェネティクスシステムを応用して、pKSF-MuNoV-S7 を構築した。RAW 細胞、293T 細胞の双方で感染性粒子作出が確認された。

[中西章(国立長寿医療研究センター)、片山和彦、戸高玲子、村上耕介、脇田隆字]

(3) ノロウイルス(NoV)のゲノム解析

2010年4月~2011年3月の間に全国20カ所の衛生研

究所で収集した感染者糞便を用い、NoV 遺伝子型 GII/4GII/3, GII/2 のゲノム全長の塩基配列の解析を試みた。少なくとも7種の GII/4 の単系統亜株が急性胃腸炎の集団発生に関わっていた。ゲノム組換え点として、ORF1/ORF2 境界の高度保存領域を見いだした。北海道、大阪の検体から、これまでの GII/4 のサブクラスターのいずれにも属さない新たな GII/4 変異株が検出された。また、GII/2, GII/3 にも新たなサブクラスターを形成する変異株が検出された。今後、これらの変異株が主要流行株となる可能性がある。

[片山和彦, 戸高玲子, 村上耕介, 横山 勝, 中村浩美, 守 宏美, 佐藤裕徳 (病原体ゲノム解析研究センター)]

(4) ノロウイルス GII に対する組織血液型抗原物質 (HBGA) の結合ポケットに競合結合するクエン酸の X 線構造解析による研究

ノロウイルス (NoV) VLP 表面に突出する P 領域には、様々なタイプの HBGA が結合することが報告され、HBGA は、NoV の受容体候補と考えられている。P 領域を大腸菌で発現し、高度に生成した後、様々な HBGA, クエン酸と混合して結晶を作成し、X 線結晶構造解析を行った。改正に成功した HBGA のすべてが、 α 1-2fucose によって P 領域に結合していた。また、クエン酸は α 1-2fucose と競合的に結合可能であり、NoV の腸管粘膜中の α 1-2fucose への結合を阻害できることを明らかにした。

[Grant S. Hansman, Christian Biertumpfel (NIH), Ivelin Georgiev (NIH), Jason S. McLellan (NIH), Lei Chen (NIH), Tongqing Zhou (NIH), Kazuhiko Katayama and Peter D. Kwong (NIH)]

(5) X 線結晶構造解析を用いたノロウイルス GII にブロードレンジに反応するモノクローナル抗体 5B18 と VLP との結合様式の研究

ヒトノロウイルスの GII をブロードレンジに検出可能なモノクローナル抗体 5B18 は、デンカ生研によって開発され、イムノクロマトグラフィー、ELISA 等の市販検出システムに用いられている。我々は、デンカ生研との共同研究により、5B18 の Fab 部分とノロウイルス GII の

P-domain を混合して共結晶化し, X 線結晶構造解析の手法を用いて抗体のエピトープを解析した. 解析の結果, 5B18 は, P 領域の下部に結合していることが明らかになった. 抗体の結合部分 (エピトープ) は, P1 領域と P2 領域にまたがっており, 立体構造上直列に並んだアミノ酸残基を認識していることが明らかになった. しかし, ノロウイルス粒子が, これまでに GI NV68 プロトタイプウイルスで予測されている粒子構造をとる場合, P 領域下部は, ウイルス粒子のコア部分に埋まっており, 抗体が結合するスペースがないと考えられた. そこで, GII VLP のクライオ電子顕微鏡観察を行い, GII の粒子モデル構築を行った結果, P 領域がウイルス粒子のシェル領域から高く持ち上がった構造をしており, P 領域がフレキシブルにひねり構造をとることで, 下部に抗体の腕が入り込むスペースができることが予測された. 本研究により, ノロウイルス GII の粒子は, P 領域構造がフレキシブルに変化すること, 5B18 がそれを利用して P 領域下部に結合することが明らかになった.

[Grant S. Hansman, Christian Biertu mpfel (NIH), Ivelin Georgiev (NIH), Jason S. McLellan (NIH), Lei Chen (NIH), Tongqing Zhou (NIH), Kazuhiko Katayama and Peter D. Kwong (NIH), 三木元博 (デンカ生研), 村田和義 (岡崎生理研), 脇田隆宇, 片山和彦]

(6) ブロードレンジモノクローナル抗体 5B18 のエピトープ解析

ノロウイルス GII にブロードレンジに反応可能なモノクローナル抗体 5B18 のエピトープ結合部分のアミノ酸は, 三次構造上直列に配置されていた. この三次構造上直列に配置されたアミノ酸残基は, 一次構造上では, 互いに離れた 3 箇所のアミノ酸残基で構成されていた. そこで, これらを順に欠失させたミュータントを大腸菌で発現させ, ウェスタンブロッティングを用いてマッピングを行った. その結果, 5B18 は, 最も C 末端側に位置するアミノ酸配列に強く結合することが可能であるが, 他の 2 箇所のアミノ酸も 5B18 の結合に関与することが示された. これらの結果は, 構造解析で得られた構造上のエピトープが真のエピトープである事を支持していた.

[三木元博 (デンカ生研), 片山和彦]

(7) ノロウイルス網羅的全ゲノム塩基配列解析と CaliciWeb の構築

ノロウイルス (NoV) は, 構造タンパク質領域のゲノム塩基配列を用いて, GI から GV の 5 つのグループに分類できる. このうち, 人に感染するのは GI, II, IV である. GI, GII にはそれぞれ遺伝的に異なる 14-17 種類以上の genotype が存在している. これまでの我々の研究により, これら genotype のうち, 全長塩基配列が明らかにされているのは約 80% に到達した. 本年度は, 新規に 3 種類の genotype の全塩基配列を決定した. さらに, NoV を含むカリシウイルスデータベース, 情報共有サイト CaliciWeb の構築し, 国内外への塩基配列データ共有化を進めた.

[三木元博 (デンカ生研), 小沢一弘 (中部衛生検査センター), 片山和彦, 戸高玲子, 村上耕介, 三瀬敬治 (札幌医大), 脇田隆宇]

(8) ノロウイルス非構造タンパク質 p22 (3A-like protein) の機能解析

ヒトノロウイルス (NoV) の ORF1 にコードされる非構造蛋白質 3A-like protein (p22) に ER リテンションシグナル配列が存在することを明らかにした. p22 は, 細胞内の小胞体からトランスゴルジ間のタンパク質の膜輸送システムに影響を与え, 狭間に NoV の複製の場を形成する機能があることが示唆された. これは, プロトタイプ NoV である NV68 ばかりでなく, NoV GII.3, GII.4 でも同様に観察される普遍的な現象であることが明らかになった.

[Sue E. Crawford, Tyler M. Sharp (BCM), Susana Guix (BCM), 片山和彦, Mary K. Estes (BCM)]

(9) ノロウイルス, サポウイルス網羅的 VLP および抗体の作製

ノロウイルス (NoV), サポウイルス (SaV) は, 感染モデル動物も存在せず, 培養細胞で増殖させることもできない. これらのウイルスの研究, 抗原抗体検出システムの開発などにウイルス様中空粒子 (VLP) と, それを用いて作製する抗血清は, 研究用ツールとして極めて有用であ

る。当部室では、VLPと抗血清の作製を継続し、パネルを維持している。本年度は、3種類の新たなVLP、抗血清を作製した。

[朴英斌, 三木元博(デンカ生研), 小沢一弘(中部衛生検査センター), 片山和彦, 戸高玲子, 村上耕介, 李天成, 脇田隆字]

(10) ノロウイルス食中毒事例調査のためのシークエンスデータ共有化

ノロウイルス(NoV)の広域食中毒事例の早期探知に有効と考えられるシークエンスデータの共有化を実施する中で、同一塩基配列を持つNoV遺伝子型GII.4株が、北海道、大阪府の登録から見いだされた。これらの株は、2011年までに主要流行株であったGII.4 2006b, 2008a, 2009, 2010亜株とは異なるクラスターを形成しており、今後の主要流行株となる可能性が示唆された。

[野田 衛(国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部), 入谷 展弘(大阪市立環境科学研究所), 中田 恵子(大阪府立公衆衛生研究所), 斎藤 博之(秋田県環境保健研究センター), 片山 和彦, 村上 耕介, 朴 英斌, 山下 和予(感染症情報センター), 田中 忍(神戸市環境保健研究所), 西川 篤(奈良市保健所), 北堀 吉映(奈良県保健環境研究センター), 三谷 亜里子(京都府山城北保健所)]

(11) マウスノロウイルス(MuNoV)のウイルス蛋白質間とそのゲノムRNAとの相互作用

ノロウイルスの複製機構解明のためRaw264.7培養細胞で増殖するMuNoV蛋白質, ゲノムdsRNA(複製中間体二本鎖RNA), nsRNA(新規合成されたRNA)間の細胞内相互作用を、免疫沈降法を用いて調べた。複製に必須のポリメラーゼは、N-terminal protein, NTPase, VPg, dsRNAと、ウイルス粒子主構成成分VP1はVP2, VPg, nsRNAと相互作用することを示唆する結果を得た。

[下池貴志, 高木弘隆(バイオセイフティー), 岡智一郎, 村上耕介, 脇田隆字, 片山和彦]

(12) ヒトノロウイルスVLPの細胞への結合様式の解析

ヒトノロウイルス(HuNoV)の細胞への結合様式を詳細

に解析する事を目的として、共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析を行った。ヒト腸上皮様細胞株Caco-2にHuNoV VLPを加えて反応させた。VLPは細胞の分化誘導に伴って結合効率が上昇することが明らかになった。しかし、H1H2, H3型HBGA, Le a, bに対する抗体を用いて、VLPとHBGAの局在を解析したところ、HBGAとVLPの局在が必ずしも一致せず、HBGAを発現していない細胞にもVLPが結合することが明らかになった。Caco-2にはH1以外のHBGAもしくは、未知の分子を利用して細胞に結合し、感染する可能性がある。次に、ヒト腸管のバイオプシサンプルを用いて同様の検討を進めたところ、腸管表面のムチン層には、部分的にHBGAとVLPの共局在が認められた。しかし、この現象はHBGAに結合しない485株のVLPでも同様に認められた。また、細胞に侵入したVLPのほとんどはHBGAとの共局在が観察できなかった。さらにゴブレット細胞への侵入も認められた。

上記の現象から、ヒトノロウイルスは、ムチン層に存在する何らかの分子上に存在する α 1-2Fucoseに結合し、ムチン層に引っかかり、その後、HBGAとは独立した未知の分子により細胞内に速やかに取り込まれることが考えられた。現在、この未知の分子の検索が進行している。

[村上耕介, 岡智一郎, 戸高玲子, 朴 英斌, 藤井 克樹, 松田幹(名大院生命農学), 栗原千枝, 穂刈 量太(防衛医科大学第2内科), 三浦総一郎(防衛医科大学学長), メアリー・エステス(米国ベ일러医科大学), 片山和彦]

(13) ノロウイルスキャプシドタンパク質サブドメインの大腸菌での発現

ノロウイルスChiba407株(GI.4)およびNarita104株(GII.4)のVLPに対するヒト型モノクローナル抗体のエピトープを特定するための材料として、それぞれのキャプシドタンパク質(VP1タンパク質)を5つのサブドメイン(N末領域, Sドメイン, P1Nドメイン, P2ドメイン, P1Cドメイン)に分け、SUMOプロテアーゼとの融合タンパク質遺伝子を作成し、大腸菌で発現させる系を構築した。SUMO融合タンパク質を生成し、SUMOプロテアーゼ領域を除去した後、それぞれのサブドメインを用いて、ヒト型抗体の反応性を今後調

べる。

[染谷雄一, 守口匡子 (藤田保健衛生大学医学部)]

(14) NoV と血液型抗原との結合 : X 線結晶構造解析による結合解析

NoV の糖鎖認識の多様性を理解するため, これまでに, ルイス a 抗原 (Le-a) 結合能を有する GI.2 のキャプシド P ドメインと Le-a 複合体の X 線結晶構造解析を行い, Le-a の $\alpha 1, 4$ Fuc の認識に寄与する残基 (Gln389) を明らかにしてきた. 今年度は, Q389 の重要性を確認するために Q389N 変異体を作成し, その性状を解析した. Q389N 変異型のウイルス様中空粒子 (VLP) を作成し, ELISA によりその結合特性を解析したところ, 野生型に比べ Le-a との結合量が減少すると同時にルイス b 抗原 (Le-b) との結合量が増加した. 次に, 変異型 P ドメインの立体構造解析を行った. 野生型と変異型の間にはタンパク質部分の構造に違いは認められなかった. 野生型における Q389 の機能は, 変異型では N389 と水分子により代替されており, その結果, 変異型では Le-a に対する親和性が低下していると考えられた. 一方で Le-b との複合体では, 変異型では Le-b の $\alpha 1, 2$ Fuc の位置が結合部位から遠距離にシフトしており, 野生型で見られる低親和性の要因 (立体障害) が解消されていた. 以上の結果は, NoV の感染指向性が 1 アミノ酸置換で容易に変化することを示しており, NoV の感染多様性を生み出している要因の 1 つであると予測される.

[久保田智巳 (産総研), 熊谷安希子, 伊藤浩美 (産総研), 古川早苗 (産総研), 染谷雄一, 武田直和, 石井孝司, 脇田隆字, 成松 久 (産総研), 白土東子]

(15) ヒト型抗ノロウイルス抗体のウイルス-血液型抗原吸着阻害活性の検討

本研究では, ヒト由来ファージ抗体ライブラリーから多数の抗 NoV 抗体を単離・解析し, 交叉反応性抗 NoV 中和抗体の作製を試みる. これまでに, ウイルス様中空粒子 (VLP) を抗原に用い, 遺伝子型特異的, 遺伝子群内交叉反応性, そして遺伝子群間交叉反応性のヒト型抗 NoV ファージ抗体を単離してきた. 今年度は, それら抗体によ

る血液型抗原 (HBGA) への NoV VLP 吸着に対する阻害活性を検討した. Narita 104 株 (GII.4) の VLP を抗原に用いて単離した 3 種のヒト型抗体 (12A2, 12A11, 12B10) と Chiba 株 (GI/4) の VLP を抗原に用いて単離した 3 種のヒト型抗体 (CV-1A1, CV-1A5, CV-2F5) を使用した. 12A2, 12A11, 12B10 について, Narita 104 株との吸着活性が高い H, A, B, および Le-b 抗原への吸着阻害活性を, Carbohydrate-VLP binding assay の系を用いて検討した. CV-1A1, CV-1A5, CV-2F5 について, Chiba 株との吸着活性が高い Le-a と Le-b 抗原への吸着阻害活性を同様に検討した. その結果, 12A2, 12B10, CV-1A1, および CV-1A5 には, HBGA への VLP 吸着に対し高い阻害活性が認められ, これらが中和抗体である可能性が示唆された.

[守口匡子 (藤田保健衛生大学), 染谷雄一, 白土東子, 奥野良信 (阪大微研), 黒澤良和 (藤田保健衛生大学), 谷口孝喜 (藤田保健衛生大学)]

(16) マウスノロウイルス (MuNoV) の細胞内局在

ノロウイルスの複製機構を明らかにするため, Raw264.7 培養細胞で増殖する MuNoV の蛋白質, ゲノム dsRNA (複製中間体二本鎖 RNA), nsRNA (新たに合成された RNA) の細胞内局在を蛍光デコンボリューション顕微鏡によって調べた. 複製に必須のポリメラーゼは核周辺部位に dsRNA と, ウイルス粒子主構成成分 VP1 蛋白質は細胞質全体に nsRNA と共局在した. MuNoV の複製は核周辺部位で, 粒子形成は細胞質で起こり, それぞれに関与する RNA 種が示唆された.

[下池貴志, 高木弘隆 (バイオセイフティー), 村上耕介, 戸高玲子, 脇田隆字, 片山和彦]

(17) マウスノロウイルス (MNV) 感染性粒子の粒子構造の研究

ノロウイルスの感染性ウイルス粒子は, 構造タンパク質 (VP1) 180 分子と, VP2, VPg, genome RNA で構成されていると考えられている. また, ウイルス粒子の外部構造は, ウイルス様中空粒子と同等であると考えられている. ヒトノロウイルス (HuNoV) では, VLP の構造は良く解析されているが, 感染性粒子の外部並びに内部構造は明らか

にされていない。また、MNV では、感染性粒子の外部構造が VLP とは若干異なる形状を示していることが報告されている。我々はノロウイルスの感染性粒子構造を明らかにするため、クライオ電子顕微鏡観察、クライオ位相差トモグラフィを用いた、感染性ウイルス粒子の外部、内部構造を研究している。本年度は、増殖させた感染性 MNV を効率良く精製し、分散させる方法を開発し、クライオ電子顕微鏡用サンプルの調製、電子顕微鏡像の取得に成功した。

[村上耕介, 戸高玲子, 朴 英斌, 高木弘隆 (バイオセイフティ), 村田和義 (岡崎生理研), 脇田隆字, 片山和彦]

(18) ヒトノロウイルス・マウスノロウイルスのウイルスタンパク質の結晶構造解析の試み

ノロウイルスで、タンパク質翻訳因子、ゲノム合成開始因子などの機能が予測されている VPg, 構造タンパク質と非構造タンパク質としての機能を併せ持つと予測されている VP2, 以上の二つの分子は、未だ結晶構造が解かされていない。そこで、これらのタンパク質の安定した発現と、結晶化を試みた。ヒトノロウイルス U201 株と、マウスノロウイルス S7 株の VPg, VP2 は、コドンで大腸菌に最適化した後、pCold ベクターと BL21 大腸菌を用いて 10mg 以上の大量発現に成功した。以降、横浜市立大学のモスキート結晶化スクリーニング装置を用いて 100-1000 の種類の結晶条件下、結晶化を試みている。

[朴 英斌, 朴 三用 (横浜市立大学), 戸高 玲子, 下池 貴志, 脇田隆字, 片山和彦]

2. サポウイルス (SaV) に関する研究

(1) 熊本県における感染性胃腸炎の起因病原体調査とサポウイルス genogroup の年次変化

2008~2009 年度に、熊本県内の 4 つの小児科から搬入された感染性胃腸炎患者の糞便 455 検体について、NoV, SaV, アストロウイルス (AstV), アイチウイルス (AiV), ロタウイルス (RV), アデノウイルス (AdV), エンテロウイルス (EntV) と細菌培養検査を行った。SaV 陽性の場合、キャプシド領域のシークエンスにより

genogroup を決定した。SaV の系統樹解析の結果、熊本県内では SaV genogroup の年次変化が続いていること、GI, GII 株については年度によって異なるクラスターを形成することが示され、遺伝的に異なる SaV 株が毎年、新たに感染性胃腸炎を引き起こしていることが明らかとなった。本年度は、2009 年度以降の調査継続結果をまとめた。

[原田誠也 (熊本県保健環境科学研究所), 西村浩一 (熊本県保健環境科学研究所), 清田直子 (熊本県保健環境科学研究所), 片山和彦, 岡智一郎]

(2) バキュロウイルススタンパク質発現系を用いたサポウイルス様中空粒子の作製とクライオ電子顕微鏡による構造解析

近年、急性胃腸炎の原因ウイルスとしてクローズアップされてきたサポウイルスは、いまだに培養細胞での増殖ができない。ウイルス様中空粒子を用いた我々の研究により、サポウイルスはノロウイルスと同様、多様な抗原性を有することが明らかになってきた。サポウイルス GI の Akita 株の VLP を作出し、クライオ電子顕微鏡観察により構造を解析した。サポウイルスの粒子表面の突起は、ホック状の構造物で有り、球状の粒子シェル部分からヒンジを介して大きく立ち上がっていることが明らかになった。この構造にサポウイルス VP1 の一次構造をフィッティングさせ、ホモロジーモデリングにより、これまで明らかにされていなかったサポウイルスの P-domain を決定した。今後、P-domain の大腸菌による発現と P-dimer, P-particles の作製を試みる。

[岡智一郎, 李天成, 村上耕介, 片山和彦]

(3) サポウイルス抗原検出系構築を目指したモノクローナル抗体の作出

迅速、簡便でかつ多検体検出が可能なウイルス抗原検出法を開発することを目的として、サポウイルス様中空粒子 (SaV-VLPs) に対する単クローン抗体を作製している。得られたクローンの中には各 Genogroup に特異的な単クローン抗体に加え、すべての Genogroup の株に交叉反応性を示す抗体も複数得られている。本年度は、ペプチド合成によって作製した VP1 ペプチドパネルより、これらの

抗体のエピトープマッピングを行った。異なる genotype に対して公差反応性のあるブロードバンド単クローン抗体は、VP1 の一次構造の 2-3 箇所離れたエピトープを認識することが明らかになった。ホモロジーモデリングによって、これらのエピトープの位置決定を行い、3D エピトープの解析を継続している。

[北元憲利 (兵庫県立大), 岡智一郎, Hansman GS, 田中智之 (堺市衛生研究所), 村田和義 (岡崎生理研), 三木元博 (デンカ生研), 村上耕介, 片山和彦]

(4) 原因不明の集団食中毒事例より次世代シーケンサーで検出されたサポウイルスの研究

ヒト由来のサポウイルスは、4 つの genogroup (GI, GII, GIV, GV) に分別できる。原因不明の食中毒事例より、次世代シーケンサー (イルミナ MiSeq) で検出されたサポウイルスは、過去に報告された GV と近縁であったが、塩基配列の相同性は 70% を下回り、新たな genotype である可能性が示された。また、既存のプライマーで検出不可能な株である事が明らかになった。コンティグ結合後のドラフト配列より、プライマーをデザインし、配列の確認と、ゲノム全長に渡る分子系統解析を行った結果、この株は、genogroup V に属する genotype 2 として独立したクラスターを形成することが明らかになった。今後、新規デザインプライマーを用いて GV.2 の流行を追う必要がある。

[柴田伸一郎 (名古屋市衛生研究所), 黒田誠 (ゲノムセンター), 岡智一郎, 村上耕介, 脇田隆字, 片山和彦]

3. ネコカリシウイルスに関する研究

(1) ネコカリシウイルスの新規リバーシジェネティクス系の構築

ネコカリシウイルス (FCV) の複製、翻訳メカニズムの詳細はいまだ不明である。リバーシジェネティクス系は過去に構築されているが、いずれも煩雑な操作が必要、ヘルパーウイルスを必要とするなど問題点を抱えている。本年度、我々は FCV ゲノム cDNA をコードする plasmid を培養細胞に transfection するだけで FCV 感染性粒子を回収できる single step リバーシジェネティクス系の構築に

成功した。本 FCV のリバーシジェネティクス系は、ホストレンジを超えて、ヒト腎由来培養細胞 HEK293T でも、感染性粒子を産出可能で有ることが明らかになった。今後、ホストレンジを規定する因子の検索に応用可能である。

[戸高玲子, 岡智一郎, 横山勝 (病原体ゲノム解析センター), 高木弘隆 (バイオセーフティ管理室), 遠矢幸伸 (日大獣医), 村上耕介, 佐藤裕徳 (病原体ゲノム解析センター), 片山和彦]

4. ロタウイルスに関する研究

(1) 我が国におけるロタウイルスの VP7 遺伝子型分布

我が国におけるロタウイルスの網羅的分子疫学調査を実施するため、全国 6 病院から 5 歳未満の急性胃腸炎による入院症例の便検体を収集した。2012 年 2 月から 2012 年 7 月の間に合計 165 検体を収集し、ELISA 法にてスクリーニングを行ったところ、121 検体がロタウイルス陽性であった。その内訳は苫小牧市立病院 (北海道) 5 検体、由利組合総合病院 (秋田県) 42 検体、公立昭和病院 (東京都) 3 検体、江南厚生病院 (愛知県) 54 検体、公立南丹病院 (京都府) 14 検体、山口大学医学部附属病院 (山口県) 3 検体であった。VP7 の遺伝子型は G1 が 75 検体 (62%), G3 が 9 検体 (7%), G9 が 37 検体 (31%) であった。

[藤井克樹, 下池貴志, デニス・フランシス, 片山和彦]

(2) 全遺伝子型構成解析によるロタウイルス分子疫学研究

2012 年に収集したロタウイルス陽性検体について、全 11 セグメントの塩基配列を解析し、全検体の遺伝子型構成を決定した。G1 (75 検体) のうち、21 検体 (28%) は典型的な Wa-like 遺伝子型構成 (G1-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1) であったが、54 検体 (72%) は外殻タンパク質以外が DS-1-like 遺伝子型構成 (G1-P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2) を示す遺伝子分節再集合体であった。また、G3 と G9 の検体は全て Wa-like 遺伝子型構成であった。DS-1-like G1 タイプが主流株となったのは世界的に見ても異例である。

[藤井克樹、下池貴志、片山和彦]

(3) ロタウイルス遺伝子型別の流行分布と重症度との相関性に関する研究

2012年に収集したロタウイルス陽性検体について、そのVP7遺伝子型と、発生時期や流行地域との間に偏りがあるか検討した結果、2012年シーズンの前半(2月から4月)はG9が多く、後半(5月から7月)はG1が多く検出される傾向があった。G9にはlineage3とlineage6の2種類が存在していたが、lineage6は京都と愛知からのみ検出され、秋田からは1株も検出されなかった。G1のWa-like株とDS-1-like株の分布については明確な地域差は認められなかった。また、遺伝子型と重症度(Vesicari scoreおよび中枢神経症状の有無)の間に明らかな偏りは認められなかった。

[藤井克樹、下池貴志、片山和彦]

(4) ロタウイルスゲノムRNAの電気泳動によるパターン解析

ロタウイルスは、患者便検体からRNAを抽出し電気泳動(PAGE)を行うことで、ウイルスRNAのバンドパターンを解析して流行株の傾向を把握することができる。この解析法について、より簡便かつ再現性の高い手法を確立するため、核酸自動電気泳動装置MultiNA(島津)またはQIAxcel(QIAGEN)を利用できるか否か検討した。結果として、MultiNAでは再現性は高いが分離能が低く、逆にQIAxcelでは分離能は良いが再現性が低いことが明らかとなった。実用稼働させるためには、いずれの装置の場合も改良が必要であると考えられた。

[藤井克樹、村上耕介、デニス・フランシス、下池貴志、片山和彦]

5. その他

(1) セービン株由来不活化ポリオワクチンを含む4種混合ワクチンのD抗原量試験法の確立

大阪大学微生物病研究会のテトラビック、および、化学及血清療法研究所のクアトロバックには免疫賦活剤としてアルミニウムが含まれるので、D抗原量を測定

する際、何らかの方法でアルミニウムの影響を除く必要がある。今回の検討で、抗原抗体反応時にEDTAを終濃度50mMを加えることでほぼアルミニウムの影響を回避させることができた。クアトロバックの場合、抗原抗体反応は通常通り4°Cで問題なく結果が得られたが、テトラビックでは抗原抗体反応の温度を25°Cで行う必要があった。

[染谷雄一]

セービン株由来不活化ポリオワクチンを含む4種混合ワクチンの承認前試験

大阪大学微生物病研究会および化学及血清療法研究所が製造し承認申請したセービン株由来不活化ポリオワクチンを含む4種混合ワクチン、および、その減益となる3価混合不活化ポリオワクチン原液の承認前検査を行った。4種混合ワクチンは力価試験としてラット免疫原性試験を、ポリオワクチン原液はウイルス生残否定試験とD抗原量試験を行った。

[染谷雄一ほかウイルス第二部]

(4) 血液製剤におけるHCVの不活化の検討

血液製剤におけるHCVの不活化の評価はなされていない。5%アルブミン製剤にHCVを添加後1時間の液状加熱(一般的に60時間)により効率よく不活化され、感染価が 10^3 減少した。しかしこの処理でHCV RNAは分解されなかった。感染価の減少はゲノムRNAの分解ではなく、ウイルス蛋白質の変化(変性、分解など)と考えられる。今後種々の不活化法に対する不活化効率の相違を明らかにしたい。

[下池貴志、野島清子(血液・安全性研究部)、脇田隆宇、岡田義昭(血液・安全性研究部)]

II. エンテロウイルスに関する研究

1. 実験室診断およびレファレンス活動

(1) 国内エンテロウイルスレファレンスセンターとしての活動

ア) レファレンスセンターとしてエンテロウイルス標準株と標準抗血清を保管し、要望に応じて地方衛生研

研究所等に配付した。2012年度は、エンテロウイルス単味抗血清30種類、細胞30本等を配布した。ポリオウイルスの同定および型内株鑑別検査を行政検査として実施した。

[吉田 弘, 有田峰太郎, 片岡周子, 清水博之]

イ) ポリオ、手足口病、無菌性髄膜炎、ヘルパンギーナ病原体検査マニュアルの改訂を行った。改訂内容につき第33回衛生微生物技術協議会(横浜)エンテロリファレンスセンターでも報告を行った。

[飯塚節子(島根県保環研)、板持雅恵(富山衛研)、世良暢之、石橋哲也(福岡県保環研)、中田恵子(大阪府公衛研)、林志直(東京健安研セ)、山下照夫(愛知県衛研)、吉田弘、西村順裕、清水博之]

ウ) 2012年10月15日および19日に地方衛生研究所職員を対象としたウイルス短期研修に協力し、ポリオウイルス検査研修を実施した。

[吉田弘、有田峰太郎、片岡周子、清水博之]

エ) 2013年2月26日に実施された平成24年度希少感染症診断技術研修「不活化ポリオワクチン導入後のポリオサーベイランス」「ポリオウイルスの環境サーベイランス」「エンテロウイルス感染症」について講義を行った。

[吉田弘]

(2) 不活化ポリオワクチン(IPV)導入後の環境水サーベイランス導入準備

わが国における2012年9月のIPV導入に伴い、①ポリオワクチン株消失の確認、②輸入ポリオウイルス検知、を行う必要があることから、地方衛生研究所との協力のもと、環境水調査に関するネットワークを構築すべく準備を行った。なお実施面では環境水調査のためには自治体内の様々なステークホルダーとの調整の必要性が認められた。そしてSOP作成、手法の評価を行い、ポリオ検出時のガイドラインを検討した。2013年度より全国8か所は感染症流行予測調査事業で、5か所は各衛研独自の調査研究によりポリオ環境水調査を開始することとなった。

[滝澤剛則(富山県衛研)、世良暢之(福岡県保環研)、

山崎謙治、中田恵子(大阪府公衛研)、高橋雅輝(岩手県環保研セ)、筒井理華(青森県環保セ)内野清子(堺市衛研)、宇宿秀三(横浜市衛研)、岩切章(宮崎県環保研)、神保達也(浜松市保環研)、下野尚悦(和歌山県環保研セ)、北川和寛(福島県衛研)、葛口剛(岐阜県保環研)、山下照夫(愛知県衛研)、山下育孝(愛媛県環保研)、堀田千恵美(千葉県衛研)、吉田弘]

(3) ポリオを含むワクチン予防可能疾患の世界的制御のための実験室診断技術集団研修(JICA共催)の開催

第22回ポリオ実験室診断技術研修会(ポリオを含むワクチン予防可能疾患の世界的制御のための実験室診断技術研修としては第3回目)を実施した。研修期間は2013年1月14日~2月8日、研修参加者は、ミャンマー、インドネシア、ベトナム、ジンバブエ、中華人民共和国から各1名、ナイジェリア、コンゴ民主共和国から各2名の計9名であった。WHOワクチン予防可能疾患実験室ネットワークにおける国家実験室に必要な技術習得のための実習および講義を実施した。また、ポリオ根絶および麻しん排除の現状と問題点を中心とした講義および討議を行った。

[清水博之、吉田 弘、有田峰太郎、片岡周子、和田純子、脇田隆宇]

(4) WHO Global Specialized Polio Laboratory (GSL) としての活動

ア) National Polio Laboratory が存在しないラオス・カンボジアのNational Polio Laboratory として実験室診断を行った。本年度はカンボジア201検体およびラオス92検体のAFP由来糞便からポリオウイルスの分離および同定を行った。

[吉田 弘、有田峰太郎、片岡周子、和田純子、清水博之]

イ) WHO GSL として、おもにカンボジア・ベトナム等で分離されたポリオウイルスについて型内鑑別あるいは塩基配列解析を行った。ベトナムで2株の2型VDPVが検出されたが、いずれも孤発例であり、ポリオ流行を伴うVDPVの広範な伝播は認められなかった。

ウイルス第二部

[吉田 弘, 有田峰太郎, 片岡周子, 和田純子、清水博之]

ウ) 2012年4月30日-5月4日に米国CDCで行われた Polio Sequencing Accreditation Workshop および Ad Hoc Small Working Group Discussion on Development and Evaluation of New Diagnostic Reagents and Approaches to testing に参加し、ポリオウイルス実験室ネットワークにおける技術的課題について検討した。

[清水博之]

エ) 2012年6月27日-6月29日にスイスWHO本部で行われた Ad hoc Small Working Group Discussion on development and evaluation on new diagnostic reagents and approached to testing および 18th Informal Consultation on the Global Polio Laboratory Network に参加し、ポリオウイルス実験室ネットワークにおける実験室診断精度管理等について検討した。

[清水博之]

オ) 2013年2月26日-2月27日にヘルシンキで行われた WHO Ad Hoc Small Working Group Discussion on Development and Evaluation of New Diagnostic Reagents and Approaches to testing に参加し、検体からのポリオウイルス直接検出法について情報提供を行った。

[清水博之]

カ) 2013年3月11日-3月12日にWHO/WPRO(マニラ)で行われた The 4th Meeting on Vaccine-preventable Diseases Laboratory Networks in the Western Pacific Region に参加し WHO 西太平洋地域におけるポリオ実験室ネットワークの技術的課題と日本のポリオサーベイランスの現状についての情報提供を行った。

[清水博之]

(5) 国際協力活動

ア) 2012年5月8日-9日に行われた台湾 National Health Research Institute Scientific Review meeting に外部評価委員として参加し、研究成果およ

び研究計画に関する外部評価を行った。

[清水博之]

イ) 2012年8月15日-16日に行われた JICA「国家級公衆衛生政策計画管理プロジェクト」による予防接種セミナーに講師として参加し「日本のポリオ対策の現状と課題」に関する講義を行った。

[清水博之]

ウ) 2012年8月30日-31日にアジア及び国内のEV71研究者を感染研戸山庁舎に招聘し、” Current Progress in Enterovirus 71 Research in the Asia-Pacific Region “を開催し、EV71の分子疫学、病原性発現機構、ワクチン開発等に関する研究成果発表を行った。

[清水博之, 有田峰太郎, 片岡周子, 小池 智(東京都医学総合機構)]

エ) 2012年9月2日-7日に行われた、「国家級公衆衛生政策計画管理プロジェクト」によるポリオ実験室レビューに参加し、WHO および中国CDC 専門家とともに新疆ウイグル自治区CDC ポリオ実験室査察を実施した。

[清水博之]

オ) 国際協力機構からの依頼により2013年2月8日から2月28日まで中国新疆ウイグル自治区CDC ポリオ実験室 Ms. Tang HaiShu へ環境水サーベイランスに関する技術研修を行った。

[吉田弘]

2. WHO 西太平洋地域の2012年のポリオウイルス分離状況

(1) WHO 西太平洋地域のポリオウイルス分離状況

2012年にラオスおよびカンボジアから送付されたAFP症例由来の糞便検体293検体について、ウイルス分離検査及びポリオウイルスの型内株鑑別を行なった。ベトナム、カンボジアにおいてAFP検体から分離されたポリオウイルスの型内鑑別あるいは塩基配列解析を行なった。野生株ポリオウイルスは検出されなかった。

[清水博之、吉田弘、有田峰太郎、片岡周子、和田純子、脇田隆字]

(2) ベトナムで2012年に検出された2型VDPVのウイルス学的性状の解析

2012年2月に発症した Soc Trang 省の AFP 患者由来糞便検体からポリオウイルス様分離株が検出され、型内鑑別および塩基配列解析試験の結果、分離株は VP1 領域に6個所の塩基置換を有する2型VDPVと同定された。Dong Nai 省の AFP 症例からも、VP1 領域に5~6個所の塩基置換を有する2型VDPV株が分離同定された。分離株間の塩基配列相同性を確認したところ共通した塩基置換部位は1個所のみであった。2012年にベトナムの2例の急性弛緩性麻痺症例から分離された2型VDPVは、それぞれ、独立したVDPV孤発例と考えられ、長期にわたり2型VDPV伝播が継続している可能性は低いことが示唆された。

[清水博之、吉田弘、有田峰太郎、片岡周子、遠田耕平 (WHO ベトナム)、Nguyen Thi Thanh Thao (パスツール研究所)]

3. 世界ポリオ根絶計画に関わる研究

(1) 新規ポリオウイルス・エンテロウイルス検査法の開発

世界ポリオ実験室ネットワークによるウイルス学的診断では、培養細胞を用いたウイルス分離同定に基づくポリオウイルス検査を基本としているが、検査の迅速化には限界がある。そのため、糞便等の臨床検体から、直接ポリオウイルス・エンテロウイルスを検出同定する新たな検査手法が検討されているが、検体からのポリオウイルス直接検出には、検査感度・精度に関する技術的課題が多く残されている。高価な機器あるいは高度な技術を要する検査手法を用いることなく、技術レベルの異なる多くのポリオ実験室への導入が可能な簡便なウイルス検出法 (RT-LAMP 法、ポリオウイルス特異的 PA 法、ポリオウイルス受容体ナノビーズを用いた特異的濃縮法等) の開発を試みている。

[有田峰太郎、清水博之]

(2) 抗 PV 化合物 AN-12-H5 の標的の同定

PI4KB に関わる宿主遺伝子を標的とした siRNA スクリーニングを行い、AN-12-H5 の標的として OSBP および OSBP2 を同定した。AN-12-H5、および、新たに同定した抗 PV 化合物 T-00127-HEV2 は、OSBP のリガンドである 25-ヒドロキシコレステロールと同じ性質を有し、ヒト由来 RD 細胞のゴルジ体におけるホスファチジルイノシトール 4-リン酸を減少させた。このことから、これらの化合物は、ウイルスの複製の場におけるホスファチジルイノシトール 4-リン酸の産生あるいは蓄積を阻害することで抗ポリオウイルス活性を示すことが示唆された。

[有田峰太郎、小島宏建 (東京大学 創薬オープンイノベーションセンター)、長野哲雄 (東京大学 創薬オープンイノベーションセンター)、岡部隆義 (東京大学 創薬オープンイノベーションセンター)、脇田隆字、清水博之]

(3) ナイジェリアの2型VDPVの病原性解析

2005-2011年にかけて分離された2型cVDPV株の遺伝子解析と分子系統解析によると、ナイジェリアの2型cVDPVは、同一のgenetic lineageには属しておらず、異なるgenetic lineageが頻りに消長を繰り返し、そのうち、7つのgenetic lineageが、比較的長期間伝播したことが明らかとなった。異なるgenetic lineageに属する代表的2型cVDPV6株について、PVR発現トランスジェニックマウスを用いた神経病原性の解析を行った。対照として、2型弱毒Sabin2株および強毒株MEF-1株を用いた。解析した6株の2型cVDPVのうち3株は、野生株と同程度の高い神経病原性を有し、明らかな毒性復帰を示した ($PD_{50}=2.1\sim 2.4$)。これら3株と比較すると11195株および11199株は、若干弱い神経病原性を示したが ($PD_{50}=3.3\sim 3.8$)、親株であるSabin2株と比較すると神経病原性は顕著に高かった。C群エンテロウイルスとの組換えウイルスではない11200株の神経病原性は、弱毒Sabin2株と強毒株MEF-1株の中間に位置していた ($PD_{50}=5.9$)。PVR発現トランスジェニックマウスを用いた神経病原性試験の結果は、神経細胞由来HEK293細胞でのウイルス増殖効

率、および、RD 細胞における温度感受性試験の結果と、よく相関していた。

[Cara Burns, Olen Kew (米国CDC)、Asif Naeem, Rifqiyah Nur Umami、西村順裕、清水博之]

(4) 2 型 VDPV 分離株の中和抗原性解析

ナイジェリアおよびベトナムで分離された 2 型 VDPV 分離株と親株である Sabin 2 型とのアミノ酸配列の比較によると、2 型 VDPV 分離株は、抗原性決定部位にアミノ酸変異を有していたため、2 型 VDPV 株の中和抗原性の変化について検討した。本試験に用いたヒト血清検体は、日本の健康成人 32 名に由来する血清検体で、イモバックスポリオ (conventional IPV; cIPV) 追加接種前後の血清を用いた。1 型と 3 型ポリオウイルスに対する平均中和抗体価は、Sabin 株と強毒株で違いが認められ、強毒株に対する中和抗体価は、Sabin 株に対する抗体価より低い傾向が認められた。2 型ポリオウイルスに対する平均中和抗体価は、Sabin 株と強毒株で大きな違いは認められなかった。2 型 VDPV 株に対する中和抗体価も、Sabin 株に対する中和抗体価と、ほぼ同等であり、抗原性の変化は認められなかった。[福島慎二(東京医大)、中野貴司(川崎医大)、片岡周子、清水博之]

4. 日本におけるポリオフリーの維持に関わる研究

(1) ポリオ生ワクチン接種率全国累積調査

全国から 5,000 人の 2 歳児を無作為に抽出し、居住する市区町村に、ポリオ生ワクチン(OPV) 1 及び 2 回目、BCG, DPT1~4 回目、麻疹・風疹混合ワクチン(MR) 1 期を接種した月齢の調査を依頼し、回収された調査票をもとに全国累積接種率を推計した。2012 年の調査では、OPV 1 回目と 2 回目の累積接種率曲線は、生後 3, 6 ヶ月から立ち上がり、生後 12 ヶ月でそれぞれ 78.9%および 39.8%、生後 24 ヶ月でそれぞれ 85.8%および 71.9%であった。1 回目、2 回目とも、前年 2011 年調査時の生後 24 ヶ月での累積接種率、96.3%および 85.2%より大幅に低下していた。2012 年 9 月に IPV が定期接種に導入されて以降、ワクチン未接種者が接

種を受けたかについて今後の検証が必要とされる。

[高山直秀 (都立駒込病院)、清水博之]

(2) 成人における IPV 追加接種の安全性と有効性の検討

IPV の追加接種を行う機会がある健康成人 32 名を登録し、IPV を 2 回接種した結果、過去に接種歴がある場合はほとんど全例で、IPV1 回接種後に良好な抗体価の上昇が確認された。中和抗体価は、Sabin 株と野生株標準株で大きな違いは認められなかったが、3 型に対する抗体誘導は、他の型よりも少し弱い傾向があった。1975-77 年生まれとその他の世代を比較するには、OPV 接種歴の確認ができた症例数が十分ではなかった。安全性については、接種後認められた有害事象は主に接種局所の疼痛であり、重篤なものではなかった。

[福島慎二(東京医大)、中野貴司(川崎医大)、片岡周子、清水博之]

(3) 我が国の不活化ポリオワクチン導入に向けた調査・研究

日本における IPV 導入・移行期に際し、「不活化ポリオワクチンの円滑な導入のための検討会」「日本ポリオ根絶会議」等の活動を通じて、IPV 導入時・移行後に必要な基盤的情報をまとめ整理・公開した。

[清水博之]

5. エンテロウイルスおよびその他腸管ウイルスに関する研究

(1) GenBank データベースにおける EV71 キャプシドアミノ酸の解析

PSGL-1 結合性は VP1-98/145 により規定されていることが示唆されていた。そこで、VP1-98/145 にどのようなアミノ酸が存在しているのか、分離株のシーケンスを元に解析した。GenBank に登録されている VP1-98 および VP1-145 の両方を含む配列を検索したところ、のべ約 1700 株の情報が得られた。VP1-98/145 アミノ酸の組合せは 4 つに大別でき、E/G (約 9%)、E/Q (約 9%)、E/E (約 70%)、K/E (約 9%) となっていた。これ

らの組合せのうち、E/G および E/Q は PSGL-1 結合性 EV71、E/E および K/E は PSGL-1 非結合性 EV71 と予想されるので、PSGL-1 非結合性 EV71 が GenBank データベース登録株の大部分（約 80%）を占めると推測された。

[西村順裕、脇田隆宇、清水博之]

(2) 受容体 PSGL-1 への結合性を規定するエンテロウイルス 71 アミノ酸 (VP1-145) の同定

エンテロウイルス 71 Nagoya 株、02363 株、1095 株、C7-Osaka 株、75-Yamagata 株の感染性 cDNA クローンを用い、VP1-98/145 に E/G、E/Q、E/E、または K/E のアミノ酸変異を導入した。いずれのウイルス株を用いた場合にも、VP1-98/145 が E/G または E/Q の場合は PSGL-1 に結合し、E/E または K/E の場合は PSGL-1 に結合しなかった。また、1095 株を用い、VP-98E を K に置換した変異体を作製したが、PSGL-1 結合性には影響しなかった。したがって、VP-145 のアミノ酸により PSGL-1 結合性が規定されていることが明らかになった。EV71 のジェノグループに関係なく、VP1-145 が G または Q の EV71 は PSGL-1 に結合し、E の EV71 は PSGL-1 に結合しないことが推測された。

[西村順裕、脇田隆宇、清水博之]

(3) リンパ球におけるエンテロウイルス 71-02363 株の増殖とキャプシドアミノ酸 (VP1-145) の解析

エンテロウイルス 71 の 02363 株を元にした変異体で、PSGL-1 結合性変異体 (VP1-98/145 が E/G または E/Q) および PSGL-1 非結合性変異体 (VP1-98/145 が E/E または K/E) 用い、Jurkat 細胞でのウイルス増殖を検討した。02363 株を用いた場合、PSGL-1 結合性変異体は Jurkat 細胞で増殖したが、PSGL-1 非結合性変異体は増殖しなかった。さらに PSGL-1 結合性変異体の増殖は、抗 PSGL-1 抗体で阻害された。したがって、02363 株の Jurkat 細胞における PSGL-1 依存性ウイルス増殖は VP1-145 により規定されることが明らかとなった。

[西村順裕、脇田隆宇、清水博之]

(4) リンパ球におけるエンテロウイルス 71-1095 株の増殖とキャプシドアミノ酸 (VP1-145) の解析

エンテロウイルス 71 の 1095 株を元にした変異体で、PSGL-1 結合性変異体 (VP1-98/145 が E/G または E/Q)、PSGL-1 非結合性変異体 (VP1-98/145 が E/E または K/E) 用い、Jurkat 細胞でのウイルス増殖を検討した。1095 株を用いた場合、02363 株とほぼ同様な結果が得られたが、PSGL-1 非結合性変異体 (E/E) が Jurkat 細胞で増殖するように見受けられ、その増殖は抗 PSGL-1 抗体で阻害された。Jurkat 細胞で増殖した E/E ウイルスの塩基配列を解析したところ、VP1-145E が G への復帰変異を起していた。つまり、Jurkat 細胞で増殖したウイルスは、PSGL-1 結合性を獲得していることが示された。

[西村順裕、脇田隆宇、清水博之]

(5) エンテロウイルス 71 結晶構造に基づいた VP1-145 機能の解析

2012 年にエンテロウイルス 71 の結晶構造が二種類発表された。それらの VP1-145 アミノ酸を確認したところ、ひとつは Q、もう一方は E であったことから、それぞれ PSGL-1 結合株、非結合株と推測された。結晶構造において、VP1-145 はウイルス表面に位置し、5 回転軸近辺に整列していた。5 回転軸周辺にはリシン (VP1-242K および VP1-244K) が集合しており、EV71 ウイルス表面全体のなかでも、特に塩基性に富んだ領域をなしていた。VP1-145 は VP1-244K と隣接しており、VP1-145 が Q の場合、VP1-244K の側鎖は外向きであったが、VP1-145 が E の場合、VP1-244K の側鎖は内向きであった。EV71 と PSGL-1 受容体の結合には、PSGL-1 アミノ末端領域のチロシン硫酸化が必須である。したがって、PSGL-1 と EV71 の結合には、PSGL-1 の硫酸基と、外向きになった VP1-244K 側鎖が関与するものと推測した。

[西村順裕、Hyunwook Lee (ペンシルバニア州立大)、Susan Hafenstein (ペンシルバニア州立大)、片岡周子、脇田隆宇、Jeffrey M. Bergelson (フィラデルフ

ィア小児病院)、清水博之]

(6) CHO 細胞での一過性増殖エンテロウイルス 71 作製
エンテロウイルス 71 の VP1-242K および VP1-244K
の、PSGL-1 結合における役割の解析を試みた。これら
リシンをアラニンに置換したウイルスを一度 RD 細胞
で増殖させたところ、回収されたウイルスはこれらの
リシンや VP1-145 に高率に変異を起していた。そこで
復帰変異をもたないウイルスを作製するために、CHO
細胞を用いることを試みた。CHO 細胞では EV71 がほと
んど増殖しない。したがって、CHO 細胞にウイルス RNA
をトランスフェクションして作製されたウイルスは、
近隣の CHO 細胞に感染増殖しないため、復帰変異を起
しにくいと考えられた。

[西村順裕、脇田隆宇、清水博之]

(7) リアルタイム RT-PCR を用いたエンテロウイルス
71 と PSGL-1 の結合アッセイの確立

CHO 細胞で作製したエンテロウイルス 71 (CHO-EV71)
と PSGL-1 の結合を検討した。CHO-EV71 と可溶性
PSGL-1-Fc を反応させ、プロテイン G 磁気ビーズで共
沈させた。共沈したウイルスからゲノム RNA を放出さ
せるため、95 度で 5 分間加熱した。リアルタイム
RT-PCR にてウイルスゲノム検出を行ったところ、ウエ
スタンブロットングでの VP1 蛋白質検出と同様に、
ウイルスの PSGL-1 結合性を検出することができた。

[西村順裕、脇田隆宇、Jeffrey M. Bergelson (フィ
ラデルフィア小児病院)、清水博之]

(8) エンテロウイルス 71 の VP1-244 リシンと PSGL-1
結合性の解析

VP1-242 リシンおよび VP-244 リシンのいずれかまた
は両方をアラニンに置換した変異体 (EV71-K242A,
EV71-K244A, EV71-K242A-K244A) を CHO 細胞で作製し
た。EV71-K244A と可溶性 PSGL-1-Fc との結合を、リ
アルタイム RT-PCR で検出した。元株にくらべ、
EV71-K242A は約 1/100 の結合力に低下し、EV71-K244A
および EV71-K242A-K244A は PSGL-1-Fc に結合しな

った。したがって、これらのリシンが PSGL-1 との結
合に重要と考えられた。

[西村順裕、脇田隆宇、Jeffrey M. Bergelson (フィ
ラデルフィア小児病院)、清水博之]

(9) PSGL-1 の立体障害効果による抗細胞接着性

PSGL-1 により、細胞の接着性が制御されるかどうか
検討した。PSGL-1 を 293T 細胞に過剰発現したところ、
細胞は丸くなり、浮遊するようになった。PSGL-1 の過
剰発現によりインテグリン、HLA、CD25 に対する抗体
反応が低下した。PSGL-1 の細胞外領域の大部分を欠損
させた変異体では、細胞は丸くなったが浮遊しなくな
った。したがって、PSGL-1 の立体障害効果には多大な
O 型糖鎖付加が予想される細胞外領域が関与し、細胞
の形態変化には PSGL-1 の細胞内領域が関与している
ことが明らかとなった。

[梅城沙織 (山口大)、鈴木綾一 (山口大)、江馬康夫
(山口大)、下島昌幸 (ウイルス第一部)、西村順裕、
奥田優 (山口大)、水野拓也 (山口大)]

(10) PSGL-1 結合性 EV71 と非結合性 EV71 のカニクイ
ザルへの感染

これまでの解析で、エンテロウイルス 71 は、PSGL-1
を介して T 細胞に感染する PSGL-1 結合 (PB 型) 株と
PSGL-1 非結合 (non-PB 型) 株が存在し、その結合性
は VP1 タンパクの 145 番目のアミノ酸に依存すること
を明らかにしている。これらの EV71 の感染・病原性
発現機構について比較解析するため、感染性クローン
に由来する PB 及び non-PB 型株をそれぞれ感染動物モ
デルであるカニクイザルに接種し中枢神経症状等の臨
床症状の発現を観察した。感染後 0・3・7・10 日目に
直腸拭い液、咽頭拭い液、CSF の採取及び採血を行な
った。感染 10 日目に解剖し、心臓・肝臓・脾臓など
の主要臓器や脳・脊髄などの神経組織を採取した。

[片岡周子、清水博之、西村順裕、網康至 (動物管理室)、
永田典代 (感染病理部)]

(11) EV71 感染カニクイザルのウイルス学的解析

臨床症状は non-PB 型接種群において振戦などの中枢神経症状が見られたが PB 型接種群においては見られなかった。また感染後 0, 3, 7, 10 日目の血中のリンパ球数の変動を FACS 解析したところ PB 型接種群は EV71 感染前の数とあまり変化は無かったが、non-PB 型接種群においては変動が大きかった。さらに EV71 に対する血中抗体価を測定したところ、PB 型接種群では PB 型に対する抗体は検出され non-PB 型に対する中和抗体は検出されなかった。一方、non-PB 接種群では感染 10 日目でも non-PB 型 EV71 に対する中和抗体は検出されなかったが、PB 型に対する中和抗体が検出された。さらに、直腸拭い液、咽頭拭い液、剖検採材からのウイルス分離及び CODEHOP-PCR にてウイルスの検出を行ない CODEHOP-PCR 陽性サンプルでは VP1 全領域のシーケンスを行なった。ほぼ全ての CODEHOP-PCR 陽性サンプルにおいて、その VP1 アミノ酸配列は non-PB 型に変異していることが分かった。

[片岡周子、清水博之、西村順裕、網康至(動物管理室)、永田典代(感染病理部)]

(12) EV71 感染カニクイザルの病理学的解析

EV71 感染カニクイザルの神経組織(脊髄・延髄・橋・中脳・小脳・視床下部・視床・大脳皮質)における病理解析を行なった。PB 接種群及び non-PB 接種群の神経組織ではどちらも炎症や神経変成がみられたが、ウイルス抗原は検出されなかった。

[片岡周子、清水博之、西村順裕、網康至(動物管理室)、永田典代(感染病理部)]

(13) 培養細胞でのウイルス分離過程における PSGL-1 依存性エンテロウイルス 71 株の選択的分離

臨床検体からのエンテロウイルス 71 の分離には、RD 細胞や Vero 細胞等が用いられている。ウイルス分離過程における、PSGL-1 結合性および PSGL-1 結合に関与するカプシドアミノ酸の変化を検討するため、臨床検体そのもの、および、臨床検体を接種した後の、RD、Vero、Jurkat の各細胞における CPE 発現とカプシド遺伝子解析を行った。エンテロウイルス 71 陽性臨

床検体を接種した Jurkat 細胞では、ウイルス増殖は認められなかった。RD 細胞では顕著な PSGL-1 発現は認められないが、RD 細胞での EV71 分離・継代培養において、多くの分離株の PSGL-1 結合部位(VP1-145)に PB 型への変異が認められた。EV71 臨床分離株の培養細胞での分離・継代に際しては、カプシド遺伝子変異を有する PB 型 variant の選択的分離の可能性に留意する必要がある。

[Rifqiyah Nur Umami、西村順裕、清水博之]

(14) ヒト中枢神経組織におけるエンテロウイルス 71 受容体発現の解析

PSGL-1 等エンテロウイルス 71 受容体分子の局在・分布と神経病変との関連性を解析することにより、エンテロウイルス 71 脳炎を含む手足口病流行における神経病原性発現の分子機構を明らかにすることを目的として、急性エンテロウイルス 71 脳髄膜炎患者の中枢神経組織における、特異的エンテロウイルス 71 受容体分子の組織分布を解析し、エンテロウイルス 71 脳炎と日本脳炎の病理学的異同を明らかにした。また、エンテロウイルス 71 脳炎患者および対照例の中枢神経組織を用いて、エンテロウイルス 71 抗原、組織病変と PSGL-1 および SCARB2 受容体分子の分布・局在および病理学的特徴についての比較解析を行っている。

[Ong Kien Chai、Wong Kum Thong (マラヤ大学)、小池智(東京都医学総合研究所)、永田典代(感染病理部)、西村順裕、清水博之]

(15) 咽頭拭い液からのエンテロウイルス 71 の新規迅速検出法の開発

手足口病もしくはヘルパンギーナの患者の咽頭拭い液から、エンテロウイルス 71 (EV71) を特異的かつ迅速に検出する Transcription-Reverse Transcription Concerted Reaction (TRCR) 法を開発した。この TRCR 法は、これまでに知られている EV71 の全てのジェノタイプの代表株を 10 から 10³ コピーの範囲の検出限界で検出することができる。細胞培養法により EV71 が同定された EV71 陽性咽頭拭い液検体を、TRCR 法によ

り正確に同定することができた。

[中島直人(東ソー)、北森有加(東ソー)、大仲悟(東ソー)、三苫惠民(東ソー)、水田克己(山形衛研)、脇田隆宇、清水博之、有田峰太郎]

(16) 手足口病の疫学とエンテロウイルス 71 およびコクサッキーウイルス A16 の遺伝子解析

中国本土では、2008 年以来、多数の死亡例を含む手足口病あるいはエンテロウイルス71(EV71)感染症の流行が報告されている。2010 年には、中国全土で900 例以上の手足口病死亡例が発生し、公衆衛生上の大きな問題となっている。中国CDC および感染研ウイルス第二部とのあいだの疫学および実験室診断技術に関する情報共有体制を基盤として、中国で伝播しているEV71 分離株の分子疫学的解析を行ったところ、ほとんどのEV71 分離株が、中国本土固有の遺伝子型C4 に属することが明らかとなった。中国の遺伝子型C4 は1998-2013 年にかけて検出されているが、より詳細にはC4b(1998-2004 年)C4a(2003-2012 年)に分類される。中国本土で検出されるEV71 株のほとんどすべてが遺伝子型C4 である点は、中国および東アジア地域におけるEV71 ワクチン開発にとって重要な疫学的特徴と考えられる。

[Zhang Yong, Xu Wenbo(中国CDC)、清水博之]

(17) 北部ベトナムにおける手足口病の疫学とウイルス遺伝子解析

ベトナムでは、近年、死亡例・重症例を含む手足口病あるいはエンテロウイルス71感染症の流行が報告されている。2011-2012 年には、ベトナム全土で多くの死亡例を含む大規模な手足口病流行が発生し、公衆衛生上の大きな問題となっている。2011 年の手足口病流行期における、北部ベトナムにおける手足口病患者由来検体から、エンテロウイルスの検出・同定を行った。エンテロウイルス陽性検体の半数弱からエンテロウイルス71 が検出され、その他のエンテロウイルスの中ではコクサッキーA6 型およびA16 型が比較的多く検出された。2011 年のエンテロウイルス71 分離株の分子疫

学的解析を行ったところ、遺伝子型C4 が高頻度に検出されたが、遺伝子型B5 とC5 も同時期に伝播していた。

[Nguyen Thi Hien Thanh (NIHE)、清水博之]

(18) 手足口病、ヘルパンギーナ、および関連合併症の入院症例に関する全国調査

手足口病、ヘルパンギーナ、および関連合併症による入院症例の臨床疫学像を把握するために全国調査を実施している。一次調査により、全国の入院症例数および死亡症例数を推計し、二次調査により、各症例の臨床症状、検査値、病原検索結果などの詳細情報を収集する。一次調査では、全国の小児科 2507 科から 760 科を抽出して調査を実施し、521 科(回答率 68.6%)から回答を得た。二次調査では、85 診療科から 365 例について情報を得た(回答率 68%)。調査対象期間の入院患者数は、3,500 人(95%CI: 1,350-7,200)と推定された。二次調査で報告された 46 症例を除外し、306 例を解析対象とし2010 年のHFMD 流行期であった、4 月 1 日~9 月 30 日の入院患者数は、3,500 人(95%信頼区間: 1,350-7,200)と推計された。CNS 合併症の関連因子を検討した結果、「Complication あり」に対する「入院時の発熱 $\geq 39^{\circ}\text{C}$ 」の OR (95%CI) は 2.07 (1.00-4.28)、「Severe complication あり」に対する「高血糖」の OR (95%CI) は 10.6 (1.63-68.5)、「白血球増多」の OR (95%CI) は 2.36 (0.61 - 9.17) であった。

[福島若葉(大阪市立大学)、中野貴司(川崎医科大学)、清水博之]

(19) 数理モデル解析によるエンテロウイルス 71 分離株の特性解明

数理モデルを起点とした解析法により、エンテロウイルス 71 の増殖複製を定量的に把握する実験手法の開発を目的とした。解析の結果、EV71 の 3 つの分離株のウイルス複製におけるパラメーターである、EV71 分離株感染細胞の寿命、バーストサイズ、基本再生産数が算出され、分離株間で異なることがわかった。RD 細胞の倍加時間は、 10.58 ± 0.11 時間 / 日 であった。

EV71 分離株のウイルス減衰率は分離株ごとに異なっており、KED005 株は安定性が低かった。ウイルス感染増殖数理モデルを構築したところ、1095 株、KED005 株、02363 株に感染した細胞の半減期にはほとんど差異がなかった。バーストサイズおよび基本再生産数では、1095 株と KED005 株では、02363 株のそれと比較して統計的に有意かつ顕著な差異が認められた。EV71 分離株毎のウイルス産生率と伝播効率が推定され、その株間で異なることがあること、一方その細胞死滅効率には差異は見られないことがわかった。

[福原充子, 佐藤 佳, 小柳義夫(京大), 西村順裕, 清水博之]

(20) コクサッキーウイルス A6 型による手足口病流行

2011 年、感染症発生動向調査開始以来最大規模の手足口病流行が発生し、主要な原因ウイルスはコクサッキーウイルス A6 型 (CVA6) および A16 型であった。2011 年の手足口病流行時には、四肢末端だけでなく大腿部や臀部にも発疹を呈する手足口病非典型例が報告され、また、爪甲脱落症を呈する症例が認められた。2011 年に検出された CVA6 について分子疫学的解析を行った結果、2011 年流行株の VP1 遺伝子は、2008 年フィンランドの手足口病症例から検出された CVA6 株との相関性が高いことが示された。CVA6 は、我が国では従来、他のコクサッキー A 群ウイルスとともに、ヘルパンギーナの主要な原因ウイルスであったが、2008 年以降、手足口病症例からの検出が増加し、2011 年の大規模な手足口病の主要な原因ウイルスとなった。手足口病および爪甲脱落症の発症に関与する最近の CVA6 と、従来、ヘルパンギーナ発症に関与していた CVA6 は、異なる病原性を有することが示唆される。

[藤本嗣人(感染症疫学センター)、清水博之]

(21) 検体輸送用 FTA elute カードを用いたエンテロウイルス RNA の回収条件検討

エンテロウイルスを FTA elute カード(ワットマン、WB120401)へ吸着し、各種抽出バッファーを用いて抽出効率をリアルタイム PCR 法にて比較したところ、

TE-1 (pH8.0)による回収効率が高いことを示した。また HEV-A-D 群の代表株 4 種類を 10 段階希釈し回収効率を調べたところ、平均回収率は 6.1%に過ぎず、低ウイルス濃度では著しくばらつきが生じた。このため FTA elute カードを用いて RT-PCR による検出を行う場合、結果の解釈を慎重に行う必要がある。

[Li Yan (山東省 CDC)、吉田弘]

(22) 中国山東省の 2 地区でのエコーウイルス 6 型の地域内伝播解析

中国山東省内 Jinan 市および Linyi 市において 2008-2011 年の間、継時的に流入下水より検出された下水由来 E6 型分離株の塩基配列を用いて、共通祖先配列の推定、及び伝播時期の推定を試みた。その結果 2010 年 8 月から 12 月の間に、Jinan 地区から Linyi 地区にウイルスの伝播が起こったことが推定された。このように分離時期が明確なウイルス塩基配列を用い、分子進化的解析(ベイズ推定)を行うことで、環境ウイルスサーベイランスは腸管系ウイルスの伝播解析に貢献する可能性を示唆している。

[Tao Zexin (山東省 CDC)、Zhang Yong (中国 CDC)、吉田弘]

(23) 浄化センター流入水における環境ウイルスサーベイランス

九州北部地区の浄化センターで採取した流入水においてエンテロウイルスを中心とする環境サーベイランスを行った。ポリオウイルスに関しては、平成 24 年 4 月に 1 型が 3 株、5 月に 2 型が 2 株および 3 型が 1 株分離された。VP1 全領域の塩基配列を解析した結果、全て、変異数が WHO 基準以下のワクチン株 (Sabin-like) であった。また、エンテロウイルスの分離においては、コクサッキーウイルス B 群が中心であった。特に、平成 24 年度は夏場を中心にコクサッキーウイルス B5 型の検出が大部分を占めた。一方、エコーウイルスの分離は少数にとどまり、例年に比べて分離数・ウイルス種数ともに減少した。一方、比較的新しく見出された組換え株であるアデノウイルス 56 型やレオウイルスも分離された。広範なウイルス分離

能は環境ウイルスサーベイランスの有用性を示すものであった。

[中村朋史, 吉富秀亮*, 石橋哲也*, 前田詠里子*, 世良暢之* (*福岡県保健環境研究所), 吉田弘]

(24) コクサッキーB 群ウイルスの腫瘍溶解性の検討

近年ウイルス自身が本来有する腫瘍溶解性を利用した、腫瘍溶解ウイルス療法が注目されてきており、腫瘍溶解性アデノウイルスもしくは単純ヘルペスウイルスを用いた臨床研究が進められている。新たな腫瘍溶解ウイルス療法の開発を目的に、RNA ウイルスであるピコルナウイルス科のエンテロウイルス属に着目して、これまでに 28 種類のウイルスを各種ヒト癌細胞株及び腎臓、肺および骨髄ストローマ正常細胞に *in vitro* で感染させ、それらの抗腫瘍効果について比較検討した。その結果、コクサッキーウイルス B3 型(CVB3)が、正常肺線維芽細胞を障害することなく、低い感染力価によっても肺癌細胞を特異的に溶解することを発見した。CVB3 による抗腫瘍活性は受容体(CAR および DAF)依存性であった。CVB3 による特異的抗腫瘍活性はマウス担癌モデルにおいても示されたことから、新たな腫瘍溶解性ウイルス療法としての応用が期待できる。

[宮本将平、井上博之、谷憲三朗(九州大学)、清水博之]

(25) パキスタン・アフガニスタンの急性弛緩性麻痺患者糞便検体からのヒトカルジオウイルスの検出

近年、カルジオウイルス属に分類される新たな腸管ウイルス(Saffold virus)の検出が世界各地で報告されている。パキスタンにおける AFP サーベイランスにより採取された糞便検体のうち、パキスタン NIH にてポリオウイルスおよびエンテロウイルスを検出した糞便検体以外の検体から、Saffold virus 遺伝子検出およびウイルス分離を試みた。Saffold virus 特異的 RT-PCR およびリアルタイム PCR システムにより、Saffold virus 遺伝子が高頻度に検出された。LLC-MK2 細胞および HeLa 細胞を用いたウイルス分離を試みたところ、多数の CPE 因子が検出されたが、解析の結果、

ほとんどが非ポリオエンテロウイルスによる CPE であった。糞便中の Saffold virus は、LLC-MK2 細胞および HeLa 細胞における増殖効率が低く、通常的手法ではウイルス分離は困難であることが明らかとなった。

[Naeem Asif、西村順裕、清水博之、Syed Sohail Zahoor Zaidi (パキスタン NIH)]

(26) Saffold virus 全遺伝子によるゲノム遺伝子組換え解析

パキスタン・アフガニスタンの急性弛緩性麻痺患者由来糞便 943 検体から直接 Saffold virus 遺伝子を増幅し、遺伝子解析を行ったところ、71 検体が SAFV 陽性であり、新たに同定された 3 つの遺伝子型を含む多様な遺伝子型(11 genotypes)の Saffold virus の存在が明らかとなった。すべての遺伝子型の代表株について、全ゲノム遺伝子解析を行ったところ、Saffold virus 非カプシド領域において頻繁かつ広範に遺伝子組換えが起きていることが示唆された。一方、齧歯類を宿主とするカルジオウイルスと Saffold virus 間の遺伝子組換えの可能性は低く、Saffold virus は従来のカルジオウイルスとは固有のヒトカルジオウイルスとして、独立したウイルス種(species)に分類されることが示唆された。

[Naeem Asif、清水博之]

(27) 新規カルジオウイルスの病理学的診断法に関する研究

新規ヒトカルジオウイルス SAFV の神経および膵臓に対する病原性に注目し、神経疾患患者の末梢血単核球を対象にしたウイルス遺伝子の検出、および I 型糖尿病、剖検例のパラフィン包埋膵臓組織切片を用いたウイルス抗原の検出を行った。SAFV の遺伝子・抗原が検出され、ウイルス持続感染の可能性が示された。持続感染細胞の解析により SAFV 持続感染は受容体発現密度に依存した維持型持続感染であることを明らかにした。

[小谷治、永田典代(感染病理部)、清水博之]

(28) ウイルス性髄膜炎の病理学的診断法に関する研究

髄膜炎の原因として知られている主なピコルナウイルスの参照標本を作製し、免疫組織化学法による各種抗体の交差反応性について検討し、ホルマリン固定標本パラフィン包埋切片における SAFV3 および各種エンテロウイルス抗原を検出するシステムを確立した。抗SAFV 抗体は特異性を示し、エンテロウイルス A 型、B 型に交差反応性は示さなかった。抗 EV71 抗体はエンテロウイルス A 型、B 型に交差反応性を示した。抗 PV 抗体はいずれのウイルスにも交差反応性を示さなかった。抗 CVB3 抗体はエンテロウイルス A, B 型に交差反応性を示した。抗 EV-2C 抗体は SAFV 以外のエンテロウイルス抗原を検出することが可能であった。

[小谷治、永田典代(感染病理部)、清水博之]

(29) 日本の下痢症患者からの Saffold virus の検出と遺伝子解析

日本の下痢症患者由来 454 検体から Saffold virus 遺伝子検出を試みたところ、7 検体(1.5%)が陽性であった。Saffold virus 陽性検体のうち、5 検体は Saffold virus 2 型と同定され、2 株は Saffold virus 3 型であった。Saffold virus 陽性下痢症患者 4 例は、他のウイルスとの共感染であった。日本でも、2 型および 3 型 Saffold virus の伝播が確認されたが、Saffold virus の下痢症を含め、Saffold virus の特定の疾患への関与については、さらに検討が必要である。

[牛島廣治(日本大学)、清水博之]

6. ポリオウイルスのバイオセーフティ及びバイオセキュリティシステムに関する調査研究

(1) 日本におけるポリオウイルス野生株保有状況

世界的ポリオ根絶達成およびその後の OPV 接種停止を視野に入れ、WHO は「野生株ポリオウイルスの実験室封じ込めに関する世界的行動計画」を策定し、全世界で統一された基準の下、ポリオウイルス野生株の実験室封じ込めを進めることを、すべての加盟国に求めている。我が国では、西太平洋地域における野生株ポ

リオウイルス伝播の終息を受け、2000-2002 年にかけて大規模かつ広範な野生株ポリオウイルス保有施設調査が行われたが、調査票の全体的な回収率が低く、調査精度とその後フォローアップに関する多くの問題点が指摘されていた。2000-2008 年における各種の野生株ポリオウイルス保有施設調査により得られた情報を、厚生労働省と国立感染症研究所により集計・評価し、野生株ポリオウイルス感染性材料を保有する可能性のある施設をリストアップしたうえで、所管省庁の了解のもと各施設に対し保有状況調査を実施し、野生株ポリオウイルス感染性材料保有施設を特定した。保有施設リストを含む野生株ポリオウイルス実験室封じ込め第一段階最終評価報告書を WHO 西太平洋地域ポリオ根絶認定委員会に提出し、2008 年 12 月、WHO 西太平洋地域全体の野生株ポリオウイルス実験室封じ込め第一段階調査完了した。その後、WHO 西太平洋地域ポリオ根絶認定委員会からの勧奨に基づき、ポリオウイルス保有施設リストのアップデートを継続している。

[小松俊彦、ルナール純子、斎藤真紀(バイオメディカルサイエンス研究会)、清水博之]

(2) WHO ポリオ実験室ネットワーク DVD を用いたバイオセーフティ教育訓練

WHO本部ポリオ実験室ネットワーク事務局で作成したポリオ実験室バイオセーフティ教育訓練用DVDを、外国人研修生に対するバイオセーフティ教育訓練に使用した。WHOポリオ実験室教育訓練DVDは、実験室のバイオセーフティ、機器の維持管理、バイオセーフティ以外の実験室安全管理、実験室のアレンジメント等、実験室・検査室の運用・安全管理・教育訓練に関する具体的な事例が取り上げられており、病原体を取扱う実験室の安全管理の全体像を理解するうえで有用な教育訓練資料である。本研修資料を日本におけるバイオセーフティ教育訓練に用いるため和訳資料を作成した。ポリオ実験室バイオセーフティ教育訓練用DVDは、国際的に標準化されたバイオセーフティ教育プログラムのひとつとして、ポリオ実験室のみならず、臨床検体や病

原体を取扱う国内外の実験室・検査室における教育研修への活用が期待できる。

[小松俊彦、ルナル純子、斎藤真紀（バイオメディカルサイエンス研究会）、清水博之]

7. その他

平成 24 年度は 2 件の行政検査依頼があり、型内株鑑別試験等を実施した。型内鑑別試験を行ったポリオウイルスは、すべてワクチン株と同定された。

III. 肝炎ウイルスに関する研究

1. A 型肝炎ウイルス (HAV) に関する研究

(1) 2011 年の A 型肝炎流行の疫学的解析

2011 年は合計 52 株について配列解析を行なった。その結果、今年の流行株は genotype IA が 46 株、IIIA が 5 株、IIIB が 1 株であり、IA の大部分は千葉市における集団食中毒事例のものであり、この株は IA-1 に属した。2011 年の流行の原因の 1 つであった IA-2 のクラスターに属する株は 1 株（他に類似株が 2 例）のみであり、これらのクラスターに属さない IA 株として、パプアニューギニアおよびブラジルでの感染と考えられる株がそれぞれ 1 株ずつ検出された。IIIA は 2011 年も 5 株検出された。

[石井孝司、清原知子、吉崎佐矢香、佐藤知子、*島田智恵、*中村奈緒美、*多田有希、**野田 衛、脇田隆宇（*感染症情報センター、**国立衛研食品衛生管理部）、他 26 地方衛生研究所との共同研究]

(2) 日本における Genotype IIIA A 型肝炎の検出と韓国での流行との関連

日本において Genotype IIIA の HAV は輸入例を除きほとんど報告されていなかったが、2010 年の流行では約 1/4 が Genotype IIIA であり、この傾向は 2011 年も継続している。韓国で 2008 年から A 型肝炎の大流行が報告されており、その主体は IIIA であることが明らかにされている。日本の IIIA について韓国で解析されているのと同じ部位の配列を決定し系統樹解析

を行ったところ、日本と韓国の IIIA は同じクラスターに属し、韓国での流行と近年の日本の IIIA には密接な関係があることが明らかになった。

[石井孝司、清原知子、吉崎佐矢香、佐藤知子、*島田智恵、*中村奈緒美、*多田有希、**野田 衛、脇田隆宇（*感染症情報センター、**国立衛研食品衛生管理部）、他 26 地方衛生研究所との共同研究]

(3) 千葉市における A 型肝炎集団食中毒事例の解析

千葉市での集団食中毒事例は、最終的には確定診断で患者数 49 名という大きな流行となった。分子疫学的解析を行ったところ、解析可能であった検体はすべて genotype IA に分類され、2010 年の解析で IA-1 と呼んだクラスターに属し、2010 年に日本で広域的に流行した IA-2 や IIIA に属する株とは異なることが明らかとなった。また、その遺伝子配列は患者 2 検体（99.7%）を除く 34 検体が 100%一致し、同一感染源に由来する株であることが強く示唆された。これらの患者の 2010 年 11 月下旬～12 月中旬における喫食状況等の調査を実施したところ、患者は市内寿司店で調理、提供された食事を喫食していたことが明らかとなった。

[+横井 一、+田中俊光、+小林圭子、石井孝司、清原知子、吉崎佐矢香、佐藤知子、*島田智恵、*中村奈緒美、*多田有希、**野田 衛、脇田隆宇（*感染症情報センター、**国立衛研食品衛生管理部、+千葉市環境保健研究所)]

(4) A 型肝炎のリスクアセスメント

A 型肝炎は感染症法の 4 類感染症としてすべての医師は患者が発生するたびに最寄りの保健所に届け出ることが義務づけられている。2008-2012 年の A 型肝炎届出数を集計し、患者の性別、年齢、渡航歴などから、A 型肝炎感染リスクを調査した。その結果、リスクファクターとして外食頻度と海外旅行が指摘された。外食については、食品取扱従事者へのより一層の衛生管理指導が必要である。海外旅行対策としては、渡航前に余裕を持ってワクチン接種を完了できるような、疾病対策も含む旅行形態の提案が望ましい。また、A 型

肝炎は全数報告疾病であるが、届け出の不徹底による過小評価が危惧されている。診察医による届け出の徹底および聞き取り調査やサンプリングへの協力も今後のリスクアセスメントに不可欠である。

[清原知子, 多田有希 (国立感染症研究所感染症疫学センター), 石井孝司, 脇田隆字]

(5) A型肝炎血清疫学調査実施計画及び準備

当室で定期的実施しているA型肝炎の血清疫学調査の準備を始めた。サンプリングに必要な倫理委員会承認を得た。

[清原知子, 石井孝司, 脇田隆字]

(6) スリランカのA型肝炎流行における疫学調査

2010年1月11日から9月23日にかけてサンプリングした、総計223検体について確定診断、遺伝子解析を行った結果、初期は集団生活(トレーニングセンター)から拡散するA型肝炎の流行パターンが見られたが、サンプリング後期の流行は特定の拡散パターンを示さなかった。感染ウイルスは優勢な遺伝子型が時間とともに変化していくことが観察された。ワクチン接種は実施されなかったが徐々に患者発生頻度は低下しており、衛生管理等の感染対策に加えて、不顕性感染による感受性者の減少が流行阻止に役立っていると考えられる。しかしながら、集団生活と感受性者の増加が継続的に行われる軍隊のような環境では流行の遷延化は免れない。適切なワクチン使用が望まれる。

[清原知子, Dahanayaka N (スリランカ・Rajarata大学), 佐藤知子, 吉崎佐矢香, 石井孝司, 脇田隆字]

(7) 化合物および物理的条件等に対する新規HAV不活化能評価系構築に向けた予備的検討

HAVの各種不活化条件はWHOにより既に詳細に検討されている。そこで、提示された加熱条件にて確実にHAVが不活化されることをTCID₅₀アッセイで確認した。

今後、TCID₅₀アッセイをゴールドスタンダードとして培養上清に出にくいと考えられているHAVの上清中

での蛋白並びにゲノムレベルでの検出の検討や、細胞ごと回収・溶解しての抽出ゲノム最短検出時間の決定等によってHAV新規不活化能評価系の構築を目指す。

[塩田智之, 清原知子, 石井孝司, 脇田隆字]

2. B型肝炎ウイルス(HBV)に関する研究

(1) 培養細胞でのHBV複製評価系の構築

HBVの1.3倍長ゲノムを持つ発現プラスミドを細胞にトランスフェクションすることで、一過性にHBVを発現させ、HBVの複製を評価する系を構築した。サザンブロット及びreal-time PCRにより、HBV core particleに内包されるHBVゲノムDNA量を検討した結果、高い相関性を示した。HBV core particleは、HBVライフサイクルの後期過程で産生されることから、この系を用いることで、HBVライフサイクルにおける後期過程の複製を評価することが出来ると考えられる。

[杉山隆一, 山田典栄, 杉山奈央, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(2) B型慢性肝炎症例におけるエンテカビル治療に対する反応不良例の検討

B型慢性肝炎に対するエンテカビル反応不良例3例の解析を行った。患者血清よりHBV株を分離し塩基配列を確認した。得られたHBV株には既報のエンテカビル耐性変異は認めず、RT領域の他の部位に変異を認め、これらの変異がエンテカビル耐性に関与している可能性が考えられた。2症例のコンストラクトを構築し、培養細胞に導入する事によりHBVの複製が確認された。今後このコンストラクトを用い、エンテカビル耐性機序の解析を行う。

[山田典栄, 杉山隆一, 四柳宏(東京大学), 脇田隆字, 加藤孝宣]

(3) HBV genotype HによるB型急性肝炎症例の解析

型急性肝炎92例の患者血清よりHBV株を分離しgenotype(gt-)を決定した。そのうち報告例が極めて少ないgt-Hを1例認めた。その他のgtはgt-A 62

例, gt-B 14 例, gt-C 15 例であった. gt-H 症例の全長の塩基配列を解析したところ, basal core promoter 領域 nt 1762/1764, PreC 領域 nt 1896 は野生型であり, RT 領域に核酸アナログ耐性として知られる変異はなかった. S 領域の a determinant region に F134L の変異を認めた.

[山田典栄, 杉山隆一, 四柳宏(東京大学), 脇田隆字, 加藤孝宣]

(4) B 型急性肝炎症例における HBs 領域のアミノ酸変異の検討

B 型急性肝炎症例の中和エピトープとなる S 領域のアミノ酸変異を検討した. S 領域全体 (aa 1-227) では 91 例中 19 例 (20.9%), hydrophilic region (aa 110-160) では 9 例 (9.9%), a determinant 領域 (aa 124-147) では 6 例 (6.6%) に変異を認めた. ワクチンエスケープ変異として知られる T126S と, これまでに報告のない T131P/A, M133L, F134Y, P135H を認めた.

[山田典栄, 杉山隆一, 四柳宏(東京大学), 脇田隆字, 加藤孝宣]

(5) 人工ヌクレアーゼ TALEN による HBV 複製抑制効果の検討

人工ヌクレアーゼである TALEN はゲノムを改変するツールとして最近開発された. 一方, HBV は複製過程において cccDNA とよばれる mini chromosome 構造をとることで治療を困難にしている. そこで HBV cccDNA を標的として HBV 特異的 TALEN を設計し HBV 複製抑制効果を検討した. HepG2 細胞に HBV 発現プラスミド及び TALEN 発現プラスミドをコトランスフェクションし, サザンブロットにより評価した結果, TALEN により HBV 複製の抑制が確認できた.

[杉山隆一, 山田典栄, 杉山奈央, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(6) Screening of Human Kinases regulating HBV life cycle

Protein kinases are key regulators of cell function. By adding phosphate groups to substrate proteins, they direct the overall function of many proteins. We performed a functional screening analysis using siRNA library targeting 501 human kinase gene. The effect of knocking down these kinases on HBV replication is studied. Hits were identified, and mechanistic analysis is undergoing.

[Hussein H Aly, Kazuaki Chayama, Takaji Wakita]

(7) Establishing cell line highly permissive to HBV infection

Only primary human hepatocytes can support HBV infection efficiently. We are trying to establish efficient HBV infection in other cell lines. We isolated liver progenitor cells After conditional immortalization, we already establish a stable cell line. Cellular differentiation study is recently undergoing to establish functional, differentiated hepatocytes that can be used for HBV infection analysis.

[Hussein H Aly, Takanobu Kato, Takaji Wakita]

(8) Screening of Human Helicases regulating HBV cccDNA formation

Human helicases play important role in HBV-DNA repair to form cccDNA. Using shRNA library targeting 136 human helicase genes, we performed a functional assay and monitoring its effect on HBV replication in Hep38.7-Tet cells. The effect of knocking down these Helicases on HBV replication is studied. Hits were already identified, its function on the formation of HBV cccDNA is confirmed and the mechanistic analysis is undergoing.

[Hussein H Aly, Takaji Wakita]

(9) HBV 感染評価系の樹立と、感染感受性を変化させるサイトカインのスクリーニング

HepaRG 細胞を用いて HBV 感染を評価できる実験系を樹立した。この系において、これまでに HBV 吸着を阻害することが報告されているヘパリンやポリリジンが HBV 感染を阻害することが確認された。この実験系を用いて HBV 感染感受性を変化させるサイトカインのスクリーニングをおこなった結果、IL-1beta の前処理によって HBV 感染が低下することが認められた。

[渡士幸一, 脇田隆字]

(10) HBV 侵入を阻害する低分子化合物のスクリーニング

前述 HepaRG 細胞を用いた HBV 感染評価系を用いて、HBV 侵入を阻害する化合物をスクリーニングした。その結果、7 種類の化合物を HepaRG 細胞に前処理した場合、HBV 感染が有意に低下することが認められた。

[渡士幸一, 脇田隆字]

(11) 高効率 HBV 複製細胞系の樹立とその解析

単一細胞クローニング法により、HBV を恒常的に産生する細胞株として HepG2.2.15.7 細胞を、またテトラサイクリン除去によって HBV 産生を誘導できる細胞株 Hep38.7-Tet 細胞を樹立した。HepG2.2.15.7 細胞は高レベルの HBs 抗原を、Hep38.7-Tet 細胞は高い HBV DNA 量を産生していることがわかった。

[渡士幸一, 岩本将士, 脇田隆字]

(12) HBV 複製を阻害する低分子化合物のスクリーニングとその機能解析

前述 Hep38.7-Tet 細胞を用いて、HBV 複製を抑制する低分子化合物のスクリーニングをおこなった。その結果、HBV DNA 量を 1/10 以下に低下させるものとして 10 化合物を得た。これらのうち、3 化合物は核酸アナログ誘導体であった。

[岩本将士, 渡士幸一, 脇田隆字]

(13) 酵母発現 B 型肝炎ウイルス (HBV) 粒子を用いた細

胞表面結合蛋白質の探索

組換え酵母由来 HBV L 蛋白質により形成されるウイルス粒子を用いて、ヒト肝臓由来細胞やマウス肝臓由来細胞、さらにヒトの肝臓以外の組織由来の細胞株等に対する結合を解析した。その中でウイルスが最も良く結合する細胞とほとんど結合を示さない細胞について、異なる安定同位体標識アミノ酸含有培地で培養した後に、細胞表面蛋白質をビオチン標識し、精製を行った。さらに質量分析法を用いて発現レベルの異なる蛋白質を同定した。

[鈴木亮介, 松田麻未, 黒田俊一 (名古屋大), 岡本徹 (阪大微研), 松浦善治 (阪大微研), 脇田隆字]

(14) 増殖効率の向上したウイルス感染系及びモニターの簡便な評価系の構築

9 人の HBV 患者血清から HBV 遺伝子をクローニングし、HBV 遺伝子配列を同定した。次に、患者配列の HBV 発現プラスミドを構築、Huh-7 細胞に導入して HBV 複製活性 (HBV DNA 量、HBsAg 量) を評価した。患者配列の細胞内外 HBV DNA 量は実験室株と同等若しくはわずかな低下に留まった。一方、患者配列の細胞外 HBsAg 量は実験室株と同等若しくは顕著に増加していた。

[小倉直樹 (JT 医総研), 渡士幸一, 脇田隆字]

(15) B 型肝炎の血清疫学調査 (2)

国立感染症研究所国内血清銀行に保管されている血清のうち、小児 (4-9 歳) 血清 2000 検体 (2005-2011 年採血) について HBs 抗原検査を行った。サンプリング地域は 15 府県、男児 1085 検体であった。Enzygnost HBsAg5.0 (シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社) を用い、疑陽性を避けるためカットオフは 100mIU/ml に設定した。HBs 抗原陽性検体は遺伝子型別も実施した。2000 検体中、6 検体が HBs 抗原陽性であった。年齢は 5-9 歳で、採血年や地域的な偏りは見られなかった。2 検体は同地域から得られた検体で、シーケンスから共通の感染源を持つことが疑われた。過去に行われた調査結果から、小児における慢性 B 型肝炎は少ない (0.05% 以下) と予測されていた

が、我々の調査では HBs 抗原陽性率 0.3%と予測より高い結果になった。現行の母子感染防止対策は有効な手段であるが、感受性者の増加、外国由来の遺伝子型ウイルスの増加、患者の若年化等の状況変化を考慮し、水平感染リスクを再検討する必要がある。

[清原知子, 石井孝司, 脇田隆字]

(16) B型肝炎ワクチンの試験管内試験法の実用化に向けて

市販のワクチンとそれらを加温変性した低力価ワクチンについて、*in vivo* 及び *in vitro* 力価試験を行い、力価検出傾向の差を比較した。メーカーA のワクチンは *in vitro* 試験で 50%以上の抗原量減少にもかかわらず *in vivo* 試験では抗体誘導能がほとんど落ちなかった。これは、現行の *in vivo* 試験で十分な力価があっても *in vitro* 試験では低力価と判定されることを意味する。一方、メーカーB のワクチンは *in vivo* 試験と *in vitro* 試験で同じ傾向を示した。今回の結果により、*in vivo* 試験から *in vitro* 試験への移行は試験法だけでなく、各メーカー別の新参照ワクチンの制定、力価の合格範囲を検討する必要があることが明確になった。今後は検体数を増やして各メーカーのワクチンの反応性を確認する。また、実用化に向けてワクチンメーカーとともに試験法や規格値の設定を協議する場を設ける。

[清原知子, 塩田智之, 李天成, 吉崎佐矢香, 佐藤知子, 石井孝司, 脇田隆字]

3. C型肝炎ウイルスの研究

(1) ビタミンDにより誘導される抗菌ペプチドの抗HCV作用の解析

ビタミンDにより免疫担当細胞において誘導される抗菌ペプチドによる抗HCV作用の検討を行った。抗菌ペプチドを培養細胞に前処理する事により、HCVの感染増殖は著明に抑制された。この抗菌ペプチドのHCVライフサイクルに与える影響を詳細に検討した結果、HCVの感染過程を阻害している事がわかった。

[松村卓哉(昭和大学), 井廻道夫(新百合ヶ丘総合病院),

椎名正明(新百合ヶ丘総合病院), 杉山奈央, 村山麻子, 藤田めぐみ, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(2) NS5A領域を置換したHCVキメラウイルスの作製と複製能の評価

HCV JFH-1株のNS5A領域を、H77株(1a型), Con1株(1b型), J6CF株(2a型), JCH-1株(2a型), JCH-4株(2a型), MA株(2b型), NDS株(2b型), J8株(2b型)に入れ換えたNS5Aキメラ株を作製し、増殖複製能を検討した。作製したNS5Aキメラ株はすべてHuh-7.5.1細胞で増殖複製が可能であり、HCV RNA導入後の細胞内のコア抗原量はほぼ同レベルであった。培養上清中のコア抗原量は遺伝子型1aの株はJFH-1株と同レベルであり、1bの株はJFH-1株より低く、2a, 2bの株はすべてJFH-1株より高い値を示した。

[村山麻子, 杉山奈央, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(3) HCV NS5Aキメラウイルスを用いた第二世代NS5A阻害剤の抗ウイルス活性の評価

第一世代のNS5A阻害剤は、内服投与によりHCV複製を強力に抑制するが、JFH-1株以外の遺伝子型2のHCV株に対しては効果が低かった。最近、第二世代のNS5A阻害剤が開発された。そこでHCV JFH-1株のNS5A領域を他のHCV株に入れ換えたキメラ株を用いて、第二世代のNS5A阻害剤の抗ウイルス活性を評価した。これらの化合物はJFH-1株および遺伝子型1(H77, Con1)のNS5Aを持つキメラ株のウイルス複製を低濃度で抑制した。同様に、遺伝子型2(J6CF, MA, J8)のNS5Aを持つキメラ株のウイルス複製も抑制した。

[村山麻子, 杉山奈央, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(4) NS5A-ISDRアミノ酸変異がHCV増殖に与える影響の検討

これまでISDRアミノ酸変異がIFN治療反応性に影響を与えることが報告されてきたが、培養細胞でのHCV感染複製系に対するISDRアミノ酸変異による影響は明らかにされていない。そこで、*in vitro*におけるISDRアミノ酸変異によるHCV増殖への影響を検討した。

ISDR アミノ酸変異が IFN 治療反応性に与える影響は主に遺伝子型 1b の症例で検討されてきたことから、構造領域が遺伝子型 2a (JFH-1 株由来) で NS5A が 1b (Con1 株由来) の組換えウイルスを用い検討した結果、ISDR アミノ酸変異により感染性ウイルス粒子の産生効率が低下することが示唆された。

[杉山隆一, 杉山奈央, 藤田めぐみ, 山田典栄, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(5) 293T 細胞における HCV の複製の検討

Claudin-1, miR-122 を恒常的に発現する 293T-CLDN/miR-122 細胞(阪大微研 松浦善治先生より供与)に全長 HCV RNA をトランスフェクションすると、細胞内のコア抗原量は Huh-7.5.1 細胞と同レベルまで増加した。培養上清中のコア抗原量は Huh-7.5.1 細胞に比べると低く、培養上清に感染性はなかった。ApoE を発現するプラスミド DNA をトランスフェクションしてから 2 日後に、HCV RNA をトランスフェクションすると、細胞内のコア抗原量には変化がなかったが、培養上清中のコア抗原量がわずかに上昇し、さらに培養上清に感染性があることが確認できた。

[村山麻子, 杉山奈央, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(6) HEK293 細胞における HCV の複製の検討

HEK293 細胞に miR-122 をレンチウイルスベクターを用いて発現させ、さらに全長 HCV RNA をトランスフェクションすると、細胞内のコア抗原量は継時的に増加したことから、この細胞内で HCV RNA は複製できることが明らかとなった。しかし、複製効率は Huh-7.5.1 細胞の 1/10-1/100 程度であった。

[村山麻子, 杉山奈央, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(7) HCV コア領域のアミノ酸変異によるインターフェロン(IFN)感受性の評価

構造領域が HCV Genotype 1b 由来、非構造領域が 2a 由来のキメラウイルスを作成し(TH/JFH1), 更に aa 70 (R/Q) と aa 91 (L/M) の変異を導入した(TH/JFH1-RL, RM, QL, QM). それぞれの RNA を Huh7.5.1 細胞にトランス

フェクションし、IFN を添加した後細胞中、培養上清中の core 抗原量を定量したが、いずれの変異株においても core 抗原量は同様に減少し、変異株間での差は認めなかった。

[藤田めぐみ, 杉山奈央, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(8) HCV コア領域のアミノ酸変異が MHC 発現誘導に与える影響の解析

Huh7.5.1 細胞に HCV を感染させたところ、MHC 発現誘導は確認されなかった。Huh7.5.1 細胞に IFN- α , β , γ を添加したところいずれの IFN でも MHC の発現誘導が見られた。最も強い誘導がみられた IFN- γ を用いて、TH/JFH1-RL, RM, QL, QM をトランスフェクションした細胞で誘導される MHC 量を比較した。その結果 QL, QM で MHC 量が低く、Core 領域 70 番アミノ酸に変異を有するウイルスは、宿主細胞内に蓄積し抗原提示能を抑制することで宿主リンパ球による細胞障害を逃れ、IFN 治療に対して抵抗性を獲得するものと考えられた。

[藤田めぐみ, 杉山奈央, Eui-Cheol Shin (韓国 KAIST), Wonseok Kang (韓国 KAIST), 脇田隆字, 加藤孝宣]

(9) JFH-1 株のコア領域アミノ酸変異がウイルス蛋白蓄積に与える影響の検討

JFH-1 株のコア領域に aa70 (R/Q) と aa91 (L/M) の変異を導入した(TH/JFH1-RL, RM, QL, QM) 株を作成した。これらの細胞内の HCV 蛋白と HCV 陽性細胞数について FACS を用いて解析したところ、いずれのクローンでも同様の値を示し変異による HCV 蛋白の蓄積を認めなかった。

[藤田めぐみ, 杉山奈央, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(10) Establishing Hepatitis C genotype-4a (HCV-4a) in-vitro model

We are aiming to establish a model supporting HCV-4a life cycle. The entire HCV-4a genome is sequenced and cloned. The major replicating clone is identified, and a replicon plasmid expressing

the non-structural region is constructed. HCV replication analysis is performed. Work is going on for establishing infectious clone.

[Hussein H Aly, Takanobu Kato, Takaji Wakita]

(11) halopemide による感染性 HCV 産生抑制機構の解析

化合物スクリーニングにより感染性 HCV 産生を低下させるものとして得られた halopemide の抗 HCV 作用メカニズムの解析をおこなった。halopemide の既存の作用のうち dopamine 阻害、phospholipase D (PLD) 阻害のうちどちらが抗 HCV 作用に関連しているかを、これらに対する別の阻害剤および siRNA によるノックダウン解析で検討したところ、PLD が感染性 HCV 産生に重要であることを示唆する結果を得た。

[内田奈々子, 渡士幸一, 脇田隆字]

(12) cyclophilin 阻害剤のインターフェロン経路への影響に関する解析

HCV 感染細胞において cyclophilin 阻害剤のインターフェロン (IFN) 情報伝達経路への影響を調べた。HCV 感染細胞では IFN- α による IFN stimulated genes のタンパク質発現誘導が非感染細胞よりも明らかに低下していたが、cyclophilin 阻害剤によりそれが解除されることが観察された。

[大東卓史, 渡士幸一, Ann Sluder (SCYNEXIS), Katyna Borroto-Esoda (SCYNEXIS), 脇田隆字]

(13) 感染性 HCV 粒子産生系を用いた天然化合物生理活性の同定

真菌抽出物より単離された天然有機化合物の生理活性を同定するために、感染性 HCV 粒子産生系を用いた。天然有機化合物ライブラリーより感染性 HCV 粒子の産生を低下させるものとして 19 化合物を得た。またこれらのうち 3 化合物は用量依存的な強い HCV 粒子産生阻害効果を有していた。これらの構造をもつ化合物は HCV 産生を低下させるものとしては報告がないものである。

[中嶋翔, 渡士幸一, 紙透伸治 (東京理科大), 菅原二三男 (東京理科大), 脇田隆字]

(14) HCV 潜在性肝炎の肝臓組織、細胞内小器官の形態変化

HCV 潜在性肝炎とは、過去 HCV に感染したことがあり、治療あるいは自然治癒で血液中のウイルスは排除されたが、肝障害が残る症例であり、原因としてウイルスが肝臓内に潜んでいることも考えられる。そこで、HCV 潜在性肝炎患者の肝臓生体検査サンプルを電子顕微鏡で観察し、ウイルス様粒子やオルガネラの変化を観察した。初めに、HCV 感染患者の肝臓生体検査サンプルを電子顕微鏡で観察し、正常の肝臓と比較したところ、Myelin figures (同心円層状封入体) が、HCV 感染患者生体検査サンプルで主に見られ、脂肪滴が蓄積した星細胞が多く観察された。

[松田麻未, 市野瀬志津子 (東京医科歯科大), 和氣健二郎 (ミノファージェン製薬), 相崎英樹, 脇田隆字]

(15) HCV ライフサイクルにおける E2 糖鎖の役割

NQ 変異解析 (Asn を Gln に置換) の結果、単一 NQ 変異で影響のない 4 ヶ所の N 型糖鎖修飾部位のうち 3 ヶ所については同時に置換してもウイルスの生活環に影響のない組み合わせがあった。その変異型は E2NQ159 (1 番、5 番、9 番) と E2NQ569 (5 番、6 番、9 番) であり、これらの変異型ウイルスの性状について解析を行った。CD81-LEL との結合性、感染中和抗体との反応性を調べたところ、どちらの変異型についても野生型のウイルスと比較して反応性が上昇していた。

[渡邊則幸, 伊達朋子, 相崎英樹, 脇田隆字]

(16) E2 タンパク質を免疫することで誘導された中和抗体の性状について

S2 細胞または 293T 細胞を用いて HCV E2 タンパク質 (それぞれ S2-E2、293-E2) を作製した。これらをマウスに免疫し誘導される E2 抗体の性状を解析した。どちらの精製 E2 タンパク質についても E2 抗体を誘導したが、感染中和効果について血清を用いて解析した

ところ 293-E2 抗体で優位に HCV 感染に対する阻害効果がみられた。また、血清から精製した IgG についても同様の結果であった。2 種の E2 タンパク質は構造が異なるようである。

[渡邊則幸, 伊達朋子, Hussein Aly, 相崎英樹, 脇田隆字]

(17) E2 ペプチドを用いた E2 抗体の認識領域の探索

293-E2 抗体の感染中和に重要な領域を調べるため、それぞれの E2 抗体の認識領域の探索を行った。E2 領域のすべてをカバーする 20 アミノ酸のペプチド (36 種類) を用いてペプチドをコートしたプレートを作製した。プレートと 2 種の E2 抗体を反応させて抗体の認識する領域を検出した。それぞれの E2 抗体の認識部位は一部では共通に反応したが、一方の E2 抗体しか反応しない領域もあった。反応の異なる領域は構造が異なるうえ感染中和に関与する領域であると予想できる。

[渡邊則幸, 伊達朋子, Hussein Aly, 相崎英樹, 脇田隆字]

(18) 昆虫細胞を用いた virus like particle (VLP) の産生および精製

S2 細胞に JFH-1 株の構造領域 (1-755) を発現させたところ、コア領域だけを発現させたものと同様に培養上清中に放出された。ショ糖密度勾配法で分画し密度を測定したところ 1.06 g/ml を示しており、コア領域だけを発現させたものと同様に VLP として分泌されることが分かった。樹立した安定 VLP 産生 S2 細胞を用いて大量発現を行い幾つかの精製方法を試みた。精製法については検討中である。

[渡邊則幸, 伊達朋子, 相崎英樹, 脇田隆字]

(19) C 型肝炎ウイルスの一過性感染性粒子を用いた細胞内侵入機構の解析

HCV の細胞侵入機構を 1 回感染性トランスパッケージング型粒子 (HCVtcp) を用いて解析した。HCVtcp は、レセプターを介した pH 依存性エンドサイトーシスに

より Huh7 細胞と Huh7.5.1 細胞へ侵入し、Huh7 細胞へは、従来の報告通りクラスリン依存性エンドサイトーシス経路を使って侵入していたが、Huh7.5.1 細胞を含め、複数のヒト肝臓由来細胞において、クラスリン非依存性経路による HCV の侵入が認められた。

[松田麻未, 鈴木亮介, 相崎英樹, 鈴木哲朗 (浜松医科大学), 脇田隆字]

(20) HCVtcp 産生系の改良と中和抗体の評価

これまでに HCVtcp 産生系を確立したが、さらに HCV レプリコンのレポーター遺伝子を改変し、検出感度を約 100 倍高める事に成功した。これまで感染価が認められなかった株を用いた HCVtcp の作製が可能となり、遺伝子型 1a、1b、2a、3a 由来の 7 つの株の感染性 HCVtcp が得られた。さらにエンベロープ蛋白質である E1 および E2 に対する抗体あるいは抗血清の中和活性評価を行い、遺伝子型の異なる HCVtcp に対して中和活性を示すモノクローナル抗体を見いだした。

[鈴木亮介, 松田麻未, 相崎英樹, 小原道法 (医学総合研), 脇田隆字]

(21) HCV-NS5A 蛋白質に結合し HCV 産生に関与する宿主因子の同定

NS5A 発現細胞から pull-down 法により NS5A に結合する膜蛋白質を精製し、プロテオーム解析、siRNA screening を行ったところ、翻訳、複製過程に関与するタンパクとして ELAVL1 を見出した。ELAVL1 は HCV RNA と結合して、ウイルスタンパク質翻訳を誘導し、さらに、NS タンパク質と結合して、HCV RNA を複製複合体ヘリクルートするものと考えられた。

[後藤耕司 (東大感染症内科), 山越智 (生物活性物質部), 小池和彦 (東大消化器内科), 鈴木哲朗 (浜松医科大学), 相崎英樹, 脇田隆字]

(22) HCV 粒子形成に関与する脂肪滴周辺膜蛋白質の同定と機能解析

脂肪滴周辺膜のプロテオーム解析、siRNA によるスクリーニングで、HCV 粒子形成に関与する生体膜蛋白質

としてHSD11を見出した。HSDはNS5Aと結合し、脂肪滴へ導くことが示された。さらに、HSDは脂肪滴の産生にも影響を与えることが判明した。

[相崎英樹, 深澤征義(細胞化学部), 花田賢太郎(細胞化学部), 本島清人(明治薬科大学), 鈴木哲朗(浜松医科大学), 脇田隆字]

(23) HCV感染細胞のメタボローム解析

HCV感染に伴う細胞内代謝の変化を理解するため、代謝物質の網羅的解析(メタボロミクス)を行った。HCV感染により、TCA回路、プリン・ピリミジン合成系など蛋白核酸合成等は低下し、ATP、GTP、phosphocreatine等のエネルギー供与体は減少し、一方解糖系は著名に亢進していた。糖代謝には構造タンパクが、その他の代謝には非構造タンパクが影響を与えている可能性が示唆された。

[松田麻未, 相崎英樹, 鈴木哲朗(浜松医科大学), 脇田隆字]

(24) HCV感染が宿主細胞のリポ蛋白の代謝に与える影響

HCV感染による肝脂肪化の原因のひとつとして、超低比重リポ蛋白(VLDL)分泌低下が報告されている。一方、VLDLはHCVの感染性に必須と報告されており、これらの矛盾点を解明するため生体での脂質輸送の中心を担っているリポ蛋白を解析した。HCV感染後、培養上清中のVLDLが増加し、低比重リポ蛋白(LDL)が低下することを見出し、その原因としてHCV感染細胞でのVLDL分解酵素であるHepatic lipase(HL)の発現低下を見出した。HCVのHL代謝に与える影響について解析している。

[相崎英樹, 鈴木哲朗(浜松医科大学), 脇田隆字]

(25) Radial-flow bioreactor(RFB)を用いた、3次元高密度培養法によるHCV感染機構の解析

RFBはヒト肝癌細胞株を3次元高密度培養できる装置である。このシステムを用いてヒト肝癌由来細胞株(FLC-4)にHCV-2a株(JFH-1株)の感染実験を行っ

たところ、培養上清中のHCV-RNA量は感染後5日目に最大 10^6 copiesに達し、以後7週間以上にわたり持続的に検出できた。平皿培養では感染が成立しなかった事より、細胞を三次元培養する事で感染・増殖が成立したと考えられた。HCVの生活環の場である生体膜に注目し、三次元と二次元で比較プロテオーム解析を行っている。

[松本喜弘(慈恵医大消化器内科), 相崎英樹, 永森収志(阪大医学部), 松浦知和(慈恵医大中央検査), 脇田隆字]

(26) グリチルリチンのC型肝炎ウイルスに対する抗ウイルス作用の解析

慢性C型肝炎患者に用いられているグリチルリチンの抗HCV作用について検討した。その結果、HCV生活環のうち、特に感染性粒子形成において強い阻害効果を示した。その阻害効果はPLA2の抑制とautophagy亢進によるものの可能性が示唆された。

[松本喜弘(慈恵医大消化器内科), 青柳春代, 相崎英樹, 松浦知和(慈恵医大病院中央検査部), 和氣健二郎(ミノファーゲン製薬), 脇田隆字]

(27) 肝繊維化における肝星細胞の役割の解析

肝星細胞の活性化が肝線維化と密接に関連していることから、HCVが肝星細胞で複製増殖するかを明らかにすることは重要な課題である。HCVサブゲノムRNAを不死化ヒト肝星細胞に導入しHCVゲノムが恒常的に複製する細胞株の樹立に成功し、ウイルス複製に伴う細胞外マトリックス関連遺伝子の発現変化について解析した。JFH-1株はヒト肝星細胞株へのレセプター依存的な感染は認められなかったが、細胞間伝搬様式で肝癌細胞から星細胞へ移行する可能性が示されたのでその仕組みについて解析している。

[渡邊則幸, 青柳春代, 相崎英樹, 鈴木哲朗(浜松医科大学), 脇田隆字]

(28) 霊長類モデルを用いた培養細胞由来HCV粒子ワクチンの有効性の検討

HCV ワクチンとしてのヒトにおける効果を類推する上では、ヒトにより近い霊長類モデルを用いた検討が重要である。そこで霊長類モデルとしてアカゲザルを選択し、培養細胞由来 C 型肝炎ウイルス粒子 (HCVcc) の免疫原性及の解析を行った。不活化 J6/JFH-1 HCVcc をアジュバントと共にアカゲザルに投与したところ、Alum を用いて免疫したアカゲザル血清より精製した抗体は、J6 だけでなく遺伝子型の異なる TH の E2 タンパク質をも認識し、J6 HCVpp の感染を濃度依存的に阻害する事を見出した。また、生化学的血液検査および病理学的組織解析の結果、HCVcc ワクチンに起因する異常は認められなかった。

[横川寛, 森山正樹 (東レ医薬研), 中村紀子 (東レ医薬研), 東濃篤徳 (京大霊長類研), 明里宏文 (京大霊長類研), 石井孝司, 加藤孝宣, 脇田隆字]

(29) フェージディスプレイ法により見出したヒト抗 E2 抗体の HCV に対する感染中和活性の検討

HCV 感染患者より得た脾細胞から total RNA を抽出し、抗体遺伝子ライブラリーを作製してフェージディスプレイ法にて HCV E2 エンベロープタンパク質に親和性を示す抗体をスクリーニングした。スクリーニングにて見出した 3 種の IgG 抗体に関して、HCVpp に対する感染中和活性を検討した。その結果、遺伝子型 1b である TH HCVpp および遺伝子型 2a である J6 HCVpp に対する感染中和活性が強い抗体であることを見出した。また、J6/JFH-1 HCVcc に対しても強い感染中和活性を示し、内 2 つの抗体クローンでは細胞側受容体 CD81 に対する抗体よりも感染中和活性が強いという結果となった。

[横川寛, 赤澤大輔 (東レ医薬研), 中村紀子 (東レ医薬研), 篠原みどり (抗体研究所), 石井孝司, 加藤孝宣, 脇田隆字]

(30) 高純度 HCV 粒子精製方法の構築

近年、C 型肝炎ウイルスは感染性粒子の細胞培養系が確立され、その不活化粒子は中和抗体を産生しうる抗原としてワクチン開発への利用が期待されている。本

研究では、簡便にスケールアップが可能であるイオン交換クロマトグラフィー法を用いた HCV 粒子の精製方法を選択し、その精製効率を検討した。イオン交換精製の検討の結果、核酸溶出ピークに HCV 粒子が共溶出し、核酸が精製効率の低下を招いている可能性が示唆されたため、Benzonase nuclease を用いて精製前サンプルを処理した。その結果、Benzonase 処理により HCV 粒子の回収量が増加し、精製効率が改善した。

[横川寛, 森山正樹 (東レ医薬研), 中村紀子 (東レ医薬研), 石井孝司, 加藤孝宣, 脇田隆字]

(31) 患者血清中の minor な株の存在を解析

昨年度までに血清中に存在する HCV ゲノム配列を全長にわたり決定する手法を開発した。これを用いて HCV 陽性患者の血清を経時的に解析し、それぞれ 3 種類の独立した HCV ゲノム配列を決定した。3 種類以外の minor な株の存在比を解析するために、3 種類を識別可能な core~E1 領域の 500bp 程度の領域を増幅し、454 GS Jr. で解析した。3 種類に含まれない株が経時的に存在したがその割合は 10% 未満であり、主に存在する株の全長配列を同定できていることが確認できた。

[安東友美, 相崎英樹, *杉山真也, *溝上雅史, 脇田隆字 (*国立国際医療センター)]

(32) HCV ゲノム上に存在する薬剤感受性予測因子の血清中での存在様式

HCV 陽性患者の血清を経時的に解析し、それぞれ 3 種類の独立したウイルスゲノム配列を決定した。インターフェロンに対する治療感受性予測因子として報告されている core 70 番のアミノ酸と NS5A に存在する IRRDR 領域について、感受性予測因子が同一のゲノム上に共存することを確認した。感受性予測因子保有株と非保有株は独立して進化することが系統樹解析から示唆された。これまで core 70 番のアミノ酸の変化は変異に依ると考えられてきたが、感受性予測因子保有株と非保有株の存在比の変化である可能性が示された。

[安東友美, 相崎英樹, 脇田隆字]

(33) 複数の検体を用いたHCV多様性の解析

インターフェロンに対する治療感受性予測因子として報告されているcore 70番のアミノ酸が、グルタミン(Q:非感受性)とアルギニン(R:感受性)の混合となっている4検体について、core~E1領域の500bp程度の領域を増幅しクローニングを行ない、12クローンずつシーケンスを解析した。core 70番がQのクローンとRのクローンとに分類したところ、各検体について2グループ間の配列は明らかに異なり、非同義置換をも含んでいた。core 70番のアミノ酸が異なる複数の独立した株が、患者血清中に共存することが示唆された。

[安東友美, 相崎英樹, 脇田隆字]

(34) 複数の検体を用いたHCV多様性の解析 2

インターフェロンに対する治療感受性予測因子として報告されているcore 70番のアミノ酸が単一の4検体について、core~E1領域の500bp程度の領域を増幅しクローニングを行ない、12クローンずつシーケンスを解析した。各クローンのアミノ酸配列を基準に分類したところ、明らかに配列の異なる複数のクローンが存在した。core 70番のアミノ酸が単一であっても、患者血清中に複数の独立した株が共存する場合があることが示唆された。

[安東友美, 相崎英樹, 脇田隆字]

(35) JFH-1/Con1 キメラウイルス感染増殖系を用いたNS5B ポリメラーゼ阻害剤の作用の検討

NS5A と NS5B の領域に適応変異を投入したゲノム複製や感染性ウイルス産生可能な感染増殖系 JFH-1/Con1 (2a/1b 型) キメラウイルスと JFH-1 株 (2a 型), con1 株 (1b 型) を利用して HCV ポリメラーゼ阻害剤に対するの感受性について検討した。2' CMeA と PSI-6130 を添加した細胞では同様な阻害効果が認められた。非核酸系 NS5B ポリメラーゼ阻害剤 HCV796 の投与により用量依存的に複製阻害が認められた。一方、JTK-109 を添加した細胞では、遺伝子型 1b と 2a/1b では十分な阻害効果がみられたが、遺伝子型 2a では JTK-109 に対して非感受性であった。

[ススムエー, 伊達朋子, 相崎英樹, 脇田隆字]

(36) 複製効率の良い遺伝子型 2b の構築の検討

細胞培養で複製効率の良い遺伝子型 2b のウイルス株は未だに存在しない。複製効率が上昇すると報告された適応変異 S2208I と A2217S を NS5A 領域に投入した。ネオマイシン耐性遺伝子を持つサブジェノミックレプリコンでは複製は認められなかった。そこで、複製効率を上昇すると知られた NS3, NS4A と NS5B の領域に適応変異を投入し、複製が出来るかを検討している。

[ススムエー, 伊達朋子, 相崎英樹, 脇田隆字]

(37) 全長の JFH-1/Con1 キメラウイルスの感染性粒子産生能の解析

全長の JFH-1 をバックボーンとして NS3 プロテアーゼ領域を Con1 に入れ替えたコンストラクトにサブジェノミック・レプリコンから同定した適応変異を導入した。全長キメラウイルスの合成 RNA を Huh7.5.1 細胞に導入し、経時的に上清及び細胞を回収し、HCV コア蛋白質量を測定した。その結果、細胞内のコア蛋白質は RNA 導入後、72-96 時間で JFH-1 とほぼ同じレベルまで増加した。その一方、上清中のコア蛋白質は 96 時間後に少量検出されたが、JFH-1 と比べてかなり低かった。

[金ソレイ, 伊達朋子, 加賀美奈子, 相崎英樹, 脇田隆字]

(38) 全長 JFH-1/Con1 キメラウイルスの性質の解析

上清中に分泌された HCV 蛋白質がウイルス粒子であるかを確かめるため、ショ糖密度勾配遠心で解析すると、キメラウイルスは JFH-1 より軽い密度までブロードなピークを示した。また免疫染色で HCV コアと脂肪滴の局在を観察すると、JFH-1 の場合、コア蛋白質は脂肪滴周囲に局在したが、キメラウイルスは脂肪滴周囲には局在せず、脂肪滴のサイズも小さいことが観察された。

[金ソレイ, 伊達朋子, 加賀美奈子, 相崎英樹, 脇田隆字]

(39) 異なる遺伝子型由来の NS3 プロテアーゼによる切断効率変化の解析

NS3 プロテアーゼの切断効率を確かめるため、NS3 プロテアーゼにより切断される IPS-1 の領域を含む Huh70K1/TG-Luc 細胞を用いてルシフェラーゼ活性でその効率を測定した。その結果、キメラウイルスのプロテアーゼ切断効率は JFH-1 に比較して3倍程度低下していた。NS3 プロテアーゼは感染性ウイルス粒子産生に重要なことが示されたが、プロテアーゼ活性の低下がその原因である可能性を示唆した。

[金ソレイ, 伊達朋子, 加賀美奈子, 相崎英樹, 脇田隆字]

(40) 全長 JFH-1/Con1 キメラウイルスを用いて NS3 プロテアーゼ阻害剤の効果を解析

JFH-1 と JFH-1/Con1 キメラウイルスそれぞれに NS3 プロテアーゼ (VX-950) を処理後、細胞内の HCV コア蛋白質量を測定した。その結果、遺伝子型 2a の JFH-1 より NS3 プロテアーゼ領域を遺伝子型 1b の Con1 に置き換えたキメラウイルスに対する阻害効果が大きかった。このことから、本研究で作製されたキメラウイルスを用いた実験系は、遺伝子型 1b 特異的な NS3 プロテアーゼ阻害剤の効果を検証可能であることが示された。

[金ソレイ, 伊達朋子, 加賀美奈子, 相崎英樹, 脇田隆字]

(41) HCV 遺伝子型 3a の培養細胞におけるウイルス感染実験系の確立

適応変異を導入した S310 株の全長 HCV RNA を合成し、Huh7.5.1 細胞に導入して経代培養した。その結果、異なる適応変異を持つそれぞれのクローンが上清中にウイルス蛋白質を分泌した。分泌された S310 ウイルス粒子をシヨ糖密度勾配遠心と感染実験より解析すると、感染性の粒子が増殖可能なことが確認され、更に S310 ウイルスの Huh7.5.1 細胞への感染が CD81 等の抗体により阻害されることが分かった。この

実験系は遺伝子型 3a の研究に役に立つと考えられる。

[金ソレイ, 伊達朋子, 横川寛, 河野環, 相崎英樹, 脇田隆字]

(42) 肝炎検査陽性者の追跡システムの構築

肝炎検査陽性者の追跡システムの構築と治療勧奨が必要であり、肝炎検査陽性者の予後向上は医療費抑制に大きく貢献できるものと期待できる。自治体によって肝炎検査陽性者リストの扱い方が大きく異なることが判明したので、それぞれの自治体に適した肝炎検査陽性者の追跡システムの構築を目指している。

[相崎英樹, 脇田隆字]

(43) 肝炎情報の収集とデータベース構築及び情報発信

肝炎ウイルス感染の予防、肝炎ウイルスキャリア対策、肝癌死亡の減少に貢献することを目的として、肝炎ウイルス感染、病態等を含む国内外の情報等の収集とデータベースの構築、および情報の提供を行って来た。感染研ウイルス第二部のホームページから、一般のヒト、家庭医、専門家向けに、それぞれ適切な内容の情報を発信している。

[相崎英樹, 田中純子 (広島大), 脇田隆字]

4. E 型肝炎ウイルス (HEV) に関する研究

(1) HEV 感染感受性 PLC/PRF/5 サブクローン cDNA ライブラリの構築

HEV 感染に感受性・非感受性の PLC/PRF/5 サブクローン細胞群は、HEV 細胞内複製の正常性、また非感受性細胞における細胞表面の HEV 結合分子の存在相関により、吸着・侵入過程の障害が示唆される。これら感染性規定宿主因子を同定するため、感受性サブクローンから抽出した mRNA より全体で 100 万個以上の cDNA を含む独立コロニーが存在する cDNA ライブラリをレトロウイルスベクターベースで作製した。しかし、それ

ぞれの独立コロニーに挿入された遺伝子サイズが小さい傾向があることから、来年度は目的の遺伝子の ORF 全体が含まれるような各挿入遺伝子サイズの大きい、さらに品質の高いライブラリの構築を目指す。

[塩田智之, 李 天成, 吉崎佐矢香, 西村順裕, 清水博之, *下島昌幸, *西條 政幸, 脇田隆字, 石井孝司 (*ウイルス第一部)]

(2) HEV 感染感受性 PLC/PRF/5 サブクローン cDNA ライブラリのスクリーニング

(1)で作製した cDNA ライブラリレトロウイルスベクターをパッケージング細胞に導入することで、パントロピックな宿主指向性を持ちライブラリを内包する単回感染性レトロウイルスを作製し、非感受性の細胞に導入する。続いて、HEV 感染細胞培養上清コーティングプレートに播種することで、当該上清中の成分に対して相互作用を示すライブラリ発現細胞のみがコロニーを形成する為、当該コロニーを増幅、ベクター特異的プライマーで配列確認をした (Panning 法)。その中で極めて興味深い感染性規定宿主因子を見いだした。既に実施した網羅的遺伝子発現比較解析との間に矛盾が見いだされていないことから現在詳細な解析を進めている。

[塩田智之, 李 天成, 吉崎佐矢香, 西村順裕, 清水博之, *下島昌幸, *西條 政幸, 脇田隆字, 石井孝司 (*ウイルス第一部)]

(3) E 型肝炎ウイルスレプリコンの構築

感染性クローン 83-2 の構造蛋白である ORF2 領域をレポーター遺伝子と置き換えることにより HEV レプリコンを構築した。レポーターとしては Neomycin, GFP, Luciferase を用いた。レポーター遺伝子の上流に HCV IRES を挿入した場合にレプリコンは機能することが明らかとなったが、Luciferase をレポーターとして用いた場合には HCV IRES を持つ場合にも機能しなかった。一方、サイズが小さい SecNanoLuc (分泌型の Luciferase) をレポーターとして導入した場合にはレプリコンは機能した。

[石井孝司, 吉崎佐矢香, 李 天成, 脇田隆字]

(4) HEV レプリコン包埋 VLP 作成の検討

構造蛋白 (ORF2) を発現する細胞に、IRES-GFPNeo を持つレプリコンを導入した細胞を作成したところ、構造蛋白の分泌が良好なクローンがあった。これらのクローンの培養上清を濃縮しショ糖遠心密度勾配で分析したところ、構造蛋白は一定の密度に収束し、粒子構造をとっている可能性が示唆された。上記のフラクションを RNase A 処理後に RNA を抽出し、構造、非構造それぞれの領域の RT-PCR を行ったところ、本フラクションの RNA は RNase A 抵抗性であり、構造領域のみが PCR で増幅されたことから、粒子中にレプリコンが包埋された粒子である可能性が示唆された。

[石井孝司, 吉崎佐矢香, 李 天成, 脇田隆字]

(5) 不活化 E 型肝炎ワクチンの検討

培養細胞で増殖した遺伝子型 G1, G3, G4 の HEV を 65°C、10 分間熱処理した後、それぞれをウサギとラットに 3 回ずつ大腿筋に接種した。接種後、経時的に採血して ELISA 法で HEV に対する抗体を測定し、さらに免疫血清の中和活性を測定した。熱処理によって不活化した各遺伝子型の HEV をウサギ、ラットに接種すると血中に抗 HEV IgG 抗体が誘導された。抗体価は 1:1,600~25,600 であり、遺伝子型間に抗体価の差が多少見られた。これらの抗体は HEV の PLC/PRF/5 細胞への感染を阻止した。この結果は、不活化 HEV によって誘導された抗体が中和活性を持つことを示唆する。ウイルスを含んでいる培養上清をカニクイザルに接種により中活性を持つ抗体が誘導され、ウイルス感染性を阻止した。

[李 天成, *網 康至, *須崎百合子, **武田直和, 脇田隆字 (*動物管理室, **大阪大学微生物病研究所, 日本・タイ感染症共同研究センター)]

(6) スペインからの E 型肝炎輸入感染症例の解析
スペイン旅行から帰国してから急性肝炎を発症した患者血清から抗 HEV IgM, IgG 抗体、HEV RNA が検出された。HEV の遺伝子型は 3 型であった。この株の配列は日本固有の HEV 株配列と異なり、フランスとスペイン由来 HEV と類似していることが判明し、本患者は旅行先のスペインで HEV に感染し

たと推測された。組換えバキュロウイルス発現システムで作製したウイルス様粒子を用いた抗原性を比較したところ、スペイン由来 HEV の抗原性は他のヒト由来 HEV と極めて類似していることが明らかになった。急性期血清を PLC/PRF/5 に接種することにより HEV の分離に成功した。わが国における E 型肝炎の輸入感染は、途上国だけではなく先進国からの可能性もあることが示唆された。

[李 天成、Tingting Yang、*落合 香織、吉崎 佐矢香、石井 孝司、脇田 隆宇、(*東京北社会保険病院)]

(7) Genotype 5 および 6 HEV 構造蛋白の発現および抗原性の解析

組換えバキュロウイルス発現システムを用いて Genotype 5 (G5 HEV) および Genotype 6 HEV (G6 HEV) の構造蛋白を発現し、ウイルス様粒子の形成およびその抗原性の解析を試みた。G5 および G6 HEV ORF2 を RT-PCR 法で増幅し、定法どおり作製した組換えバキュロウイルスを用い Tn5 細胞で構造蛋白を発現させ、ウイルス様粒子 (HEV-LPs) を作製した。HEV-LPs をウサギとモルモットに免疫し、抗 HEV-VLPs 抗体を獲得した。HEV-LPs を用いて抗体検出 ELISA 法を樹立し、G5 および G6 HEV の抗原性を従前既知の G1, G3, G4 HEV の抗原性と比較した。その結果は G5 と G6 HEV は抗 G1, G3, G4 HEV 抗体と反応し、抗 G5、G6 HEV 抗体は G3HEV の培養細胞への感染を中和した。G5 と G6 HEV は G1, G3, G4 HEV との抗原性が類似することが分かった。

[李 天成、*高橋和明、**片岡紀代、吉崎佐矢香、***網 康至、***須崎百合子、石井孝司、脇田隆宇、*三代俊治 (*東芝病院、**感染病理部、***動物管理室)]

(8) ラット HEV 疫学調査

日本およびベトナムの野生ラットから血清を採取し、ELISA 法を用いて抗ラット HEV IgG および IgM を検査した。さらに IgM 陽性の血清に対して RT-PCR 法によるラット HEV 遺伝子検査を実施した。その結果、ベト

ナム野生ラットの抗体保有率は 20% であり、HEV RNA 陽性例も存在していることが判明した。日本野生ラットにおける抗体保有率は 16% であったが、Rat HEV 陽性検体が見つからなかった。現在、日本における Rat HEV の遺伝子の調査を行っている。

[李 天成、*安田俊平、*吉松組子、*有川二郎、脇田隆宇 (*北海道大学)]

(9) E 型肝炎ウイルスに対するラットの感受性

ラット HEV は遺伝子構造上ではヒト HEV と類似するウイルスであり、その病原性やヒトへの感染性などの情報が少なく、ヒト由来 HEV がラットに感染するかどうかについてもいまだ明らかにされていない。本実験ではヒト HEV、ラット HEV に対するラットの感受性を感染実験で確認し、新しい動物モデルを見いだすことを目的として、Genotype 1, 3, 4 HEV およびラット HEV をラット尾静脈内から接種し、経時的に採血と採便を行った。血液中のウイルス抗原、特異抗体、ウイルス遺伝子、ALT/AST および、便中のウイルス抗原、抗体、およびウイルス遺伝子を測定しウイルスの感染の有無を評価した。その結果は Genotype 1, 3, 4 HEV はラットに感染しないが、Rat HEV は実験用ラットへの感染が成立した。さらに rat HEV が経口感染することを明らかにした。

[李 天成、*網 康至、*須崎百合子、脇田隆宇 (*動物管理室)]

(10) G3 HEV はヌードラットに感染しない

ヌードラット (Long Evans rnu/rnu) を用いて、rat HEV と G3 HEV に対する感受性を検討した。Rat HEV を接種したことにより、ヌードラットの血中および便中から持続的に Rat HEV RNA が検出された。また、ウイルスは主に肝臓に検出されることにより、rat HEV は主に肝臓で増殖することが明らかにした。これに対して、ヌードラットに 5×10^5 - 4×10^6 の G3 HEV を接種してもウイルスの増殖は見られなかった。免疫欠損したヌードラットにウイルスを大量に接種してもウイルス増殖しないことはラットが HEV に対する感受性を持たない

ことが示唆された。

[李 天成、*網 康至、*須崎百合子、脇田隆字 (*動物管理室)]

(11) ラット HEV 粒子形成に必須な領域の同定

ラット HEV ORF2 の N 末端から 100 アミノ酸を欠失させた構造蛋白を組換えバキュロウイルスで発現すると、直径約 24nm と 35nm の二種類の中空粒子が産生される。アミノ酸配列解析によって、この粒子蛋白は N 末端の 100 個のアミノ酸以外に C 末端から一部のアミノ酸が欠失していた。構造蛋白の N 末端、あるいは C 末端、さらに両端を欠失した種々のクローンを発現し、VLP 形成に必須な領域の同定を試みていた。N 末端から 100 個のアミノ酸を欠失させた上に、C 末端から 593 番目まで 52 個のアミノ酸を欠損させても粒子の形成には影響を与えなかったが、これ以上欠失させると粒子は形成されなくなった。したがって、粒子形成には C 末端は 593 番目のアミノ酸までが必須であった。N 末端は 123 番目まで必須である。

[李 天成、片岡紀代 (感染病理部)、脇田隆字]

(12) 中国におけるラット疫学調査

これまでに Rat HEV はドイツ、アメリカ、ベトナムから分離された。rat HEV の感染は世界範囲に広がっている可能性がある。今回我々、中国広東省で野生ラットの血清検体を採取し、ELISA 法を用いて抗ラット HEV IgG および IgM を検査した。これまでに 713 血清検体を検査した結果、166 検体は IgG 抗体陽性であり、抗体保有率は 23.3%であった。IgM 抗体の陽性率は 8.3%であった。さらに IgM 抗体陽性検体から rat HEV 遺伝子が検出され、中国で流行している rat HEV 遺伝子型はベトナム分離株に類似することが明らかになった。

[李 天成、*黎薇、*管大偉、*柯昌文、**武田直和、脇田隆字 (*中国広東 CDC、**大阪大学微生物病研究所、日本・タイ感染症共同研究センター)]

(13) スンクスは rat HEV の宿主である。

Rat HEV はラット以外の動物に感染するかどうかまだ

分からない。今回我々、中国広東省で野生スンクスの血清検体を採取し、ELISA 法を用いて抗ラット HEV IgG および IgM 抗体、RT-PCR 法でウイルス遺伝子を検査した。260 スンクス血清検体を検査した結果、10.4% (27/260) 検体は IgG 抗体陽性であり、IgM 抗体の陽性率は 4.6% (12/260) であった。さらに IgM 抗体陽性検体から rat HEV 遺伝子が検出され、塩基配列はこの地域に棲息していたラットから検出した rat HEV と一致している。この結果によりスンクスが rat HEV のもう一つの宿主であることが明らかとなった。

[李 天成、黎薇、*管大偉、*柯昌文、**武田直和、脇田隆字 (*中国広東 CDC、**大阪大学微生物病研究所、日本・タイ感染症共同研究センター)]

(14) フェレット E 型肝炎ウイルス様粒子の作製およびその応用

フェレット E 型肝炎ウイルス (Ferret HEV) は最近オランダのフェレットから検出された新型 HEV であり、遺伝子配列以外、Ferret HEV に関する情報がほとんどない。本ウイルスの疫学調査、病原性と抗原性解析のため、本研究では Ferret HEV の構造蛋白を組換えバキュロウイルスで発現し、ウイルス様粒子の作成を試みた。全長および N あるいは C 末端、さらに両端を欠失した ferret HEV ORF2 を RT-PCR 法で増幅した。定法どおり作製した組換えバキュロウイルスを昆虫細胞 Tn5 細胞に感染させ、構造蛋白を発現し、ウイルス様粒子 (ferret HEV-LPs) を作製した。ferret HEV-LPs を用いて抗体検出 ELISA 法を樹立し、ferret HEV の抗原性を従前既知の G1, G3, G4 および rat HEV の抗原性と比較したうえ、ferret HEV に関する疫学調査を行った。

[李天成、楊ていてい、*片岡紀代、網康至、須崎百合子、**岸田典子、**白倉 雅之、**今井正樹、**浅沼秀樹、***武田直和、脇田隆字 (*感染病理部、**インフルエンザセンター、***大阪大学微生物病研究所、日本・タイ感染症共同研究センター)]

(15) フェレット HEV 全長ゲノムのクローニング及び配

列の解析

Ferret HEV RNA 陽性であるアメリカ輸入ラットの糞便を出発材料として、ウイルス遺伝子を解析した。Ferret HEV RNA 陽性便を 10%便乳剤に作成し、RNA を抽出した。RT-PCR 方を用いて ferret HEV 全長配列の増幅を試みた。現在一部領域の遺伝子の増幅に成功した。部分塩基及びアミノ酸の解析により、アメリカ輸入フェレット由来の ferret HEV はこれまで報告されたもののホモロジーは 81%にとどまり、ferret HEV 遺伝子型の多様性が示唆された。

[李 天成、*網 康至、*須崎百合子、**武田直和、脇田隆宇(*動物管理室、**大阪大学微生物病研究所、日本・タイ感染症共同研究センター)]

IV. その他のウイルスに関する研究

(1) 日本脳炎ウイルスを用いたトランスパッケージングシステムの構築

抗原を効率良く大量に調製する方法として、日本脳炎ウイルスレプリコンを用いたトランスパッケージング型粒子の産生系を構築した。さらにこのウイルス粒子上に、粒子形成や細胞外への分泌を阻害する事なく外来遺伝子由来のペプチドを挿入可能な部位の探索を行ったところ、ほとんどがタグ配列の挿入により E 抗原の分泌が抑制されたものの、一部ではタグ配列の挿入にも関わらず粒子の上清への分泌が認められた。

[鈴木亮介、小西英二(阪大微研)、石川知弘(独協医大)、松田麻未、高崎智彦(ウイルス第一部)、加藤孝宣、脇田隆宇]

(2) HBoV のウイルス様粒子の作製

ヒトボカウイルス(HBoV)は 2005 年、呼吸器疾患小児患者から分離されたもので HBoV2, 3, 4, それぞれ下痢などの患者糞便から分離された。いずれにして、ヒトボカウイルスは小児下気道感染症や腸管感染症などの病気の発症とは関連すると考えられているが、これらの疾患との明確的関連は未だ確認されていない。組換

えバキュロウイルス発現システムを用いて HBoV1-4 のウイルス様粒子(VLP)の作製をして、抗体検出法を確立した。また、HBoV の VP1 と VP2 を共発現により VP1 と VP2 二種類構造蛋白を含む粒子の作成に成功した。これはウイルス立体構造の研究に有用である。

[李 天成、*片岡紀代(感染病理部)、脇田隆宇、**鈴木哲朗(*感染病理部、**浜松医大)]

<別> 検査業務

第 1 室 :

検定業務

- ・ 4 種混合ワクチンの力価試験(ラット免疫原性試験) 10 ロット
- ・ 3 価混合不活化ポリオワクチン原液の不活化試験 3 ロット
- ・ イモバックスポリオの力価試験(D 抗原量試験) 37 ロット
- ・ ロタリックス検定 2 件

承認前検査

スクエアキッズ皮下注シリンジ(平成23年2月から継続中)

ロタテック(平成22年4月から平成23年7月)

行政検査

第一室

ノロウイルス・サポウイルス・ロタウイルス

合計 13 件

第 2 室 :

平成 24 年度は 2 件の行政検査依頼があり、ウイルス分離同定、塩基配列解析等による型内株鑑別試験等を実施した。型内鑑別あるいは塩基配列解析を行ったポリオウイルスは、すべてワクチン株と同定された。

第 5 室 :

検定業務

ウイルス第二部

乾燥組織培養不活化 A 型肝炎ワクチン	4 件
組換え沈降 B 型肝炎ワクチン (酵母由来)	1 5 件

行政検査

A 型肝炎 11 件

E 型肝炎 5 件

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) Ando T, Imamura H, Suzuki R, Aizaki H, Watanabe T, Wakita T, Suzuki T. Visualization and measurement of ATP levels in living cells replicating hepatitis C virus genome RNA. *PLoS Pathog.* 2012;8(3):e1002561.
- 2) Arita M, Wakita T, Shimizu H. Valosin containing protein (VCP/p97) is required for poliovirus replication and involved in cellular protein secretion pathway in poliovirus infection. *J Virol* 86(10): 5541-53, 2012.
- 3) Date T, Kato T, Kato J, Takahashi H, Morikawa K, Akazawa D, Murayama A, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Tanaka Y, Mizokami M and Wakita T. Novel cell culture-adapted genotype 2a hepatitis C virus infectious clone. *J Virol*, 86 (19): 10805-20, 2012.
- 4) Date T, Morikawa K, Tanaka Y, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Mizokami M, Wakita T. Replication and infectivity of a novel genotype 1b hepatitis C virus clone. *Microbiol Immunol.* 2012. 56(5):308-17.
- 5) Fujii Y, Kitauro K, Matsutani T, Shirai K, Suzuki S, Takasaki T, Kumagai K, Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S, Katoh H, Hamada Y, Kurane I, Suzuki R: Immune-Related Gene Expression Profile in Laboratory Common Marmosets Assessed by an Accurate Quantitative Real-Time PCR Using Selected Reference Genes. *PLoS ONE* 2013, 8(2): e56296.
- 6) Fujii Y, Shimoike T, Takagi H, Murakami K, Todaka-Takai R, Park Y, Katayama K: Amplification of all 11 RNA segments of group A rotavirus based on reverse transcription polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol.* 2012, 56:630-8
- 7) Fukazawa H, Suzuki T, Wakita T, Murakami Y. A cell-based, microplate colorimetric screen identifies 7,8-benzoflavone and green tea gallate catechins as inhibitors of the hepatitis C virus. *Biol Pharm Bull.* 2012;35(8):1320-7.
- 8) Fukuhara M, Iwami S, Sato K, Nishimura Y, Shimizu H, Aihara K, Koyanagi Y. Quantification of the dynamics of enterovirus 71 infection by experimental-mathematical investigation. *J Virol* 87(1): 701-5, 2013.
- 9) Hansman GS, DW. Taylor, JS. McLellan, TJ Smith, I Georgiev, JRH Tame, S-Y Park, M Yamazaki, F Gondaira, M Miki, K Katayama, K Murata, PD. Kwong. Structural Basis for Broad Detection of Genogroup II Noroviruses by a Monoclonal Antibody That Binds to a Site Occluded in the Viral Particle *Journal of virology* vol. 86, 3635-46, 2012.
- 10) Harada S, Oka T, Tokuoka E, Kiyota N, Nishimura K, Shimada Y, Ueno T, Ikezawa S, Wakita T, Wang Q, Saif LJ, Katayama K. A confirmation of sapovirus-re-infection gastroenteritis cases with different genogroups and genetic shifts in the evolving sapovirus genotypes, 2002-2011. *Arch Virol.* 2012 157(10):1999-2003.
- 11) Ishii K, Kiyohara T, Yoshizaki S, Wakita T, Shimada T, Nakamura N, Nakashima K, Tada Y, Noda M. Epidemiological and genetic analyses of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010. *J Clin Virol.* 2012 53, 219-24.
- 12) Ishii K, Li TC, Yoshizaki S, Shiota T, Kato T, Takeda N, Wakita T. Cloning of permissive and nonpermissive human hepatoma cell lines

- for hepatitis E virus infection. *Hepatology International*. 6: 292 (2012)
- 13) Ishii K, Miyamura T, Kanda T, Tawada A, Sekimoto T, Wu S, Nakamoto S, Arai M, Fujiwara K, Imazeki F, Kiyohara T, Wakita T, Yokosuka O. Possible widespread presence of hepatitis A virus subgenotype IIIA in Japan: recent trend of hepatitis A causing acute liver failure. *Hepatology Research*, 42: 248-53 (2012)
- 14) Jariyapong P, Xing L, van Houten NE, Li TC, Weerachatanukul W, Hsieh B, Moscoso CG, Chen CC, Niikura M, Cheng RH. Chimeric hepatitis E virus-like particle as a carrier for oral-delivery. *Vaccine*. 2013, 31:417-24
- 15) Kanda T, Wu S, Kiyohara T, Nakamoto S, Jiang X, Miyamura T, Imazeki F, Ishii K, Wakita T, Yokosuka O. Interleukin-29 suppresses hepatitis A and C viral internal ribosomal entry site-mediated translation. *Viral Immunol*. 2012 25(5):379-86.
- 16) Kato K, Yazawa T, Taki K, Mori K, Wang S, Nishioka T, Hamaguchi T, Itoh T, Takenawa T, Kataoka C, Matsuura Y, Amano M, Murohara T, Kaibuchi K. The inositol 5-phosphatase SHIP2 is an effector of RhoA and is involved in cell polarity and migration. *Mol Biol Cell* 23(13): 2593-604, 2012.
- 17) Khamrin P, Chaimongkol N, Malasao R, Suantai B, Saikhruang W, Kongsricharoern T, Ukarapol N, Okitsu S, Shimizu H, Hayakawa S, Ushijima H, Maneekarn N. Detection and molecular characterization of cosavirus in adults with diarrhea, Thailand. *Virus Genes* 44 (2): 244-6, 2012.
- 18) Khamrin P, Thongprachum A, Kikuta H, Yamamoto A, Nishimura S, Sugita K, Baba T, Kobayashi M, Okitsu S, Hayakawa S, Shimizu H, Maneekarn N, Ushijima H. Three clusters of Saffold viruses circulating in children with diarrhea in Japan. *Infect Genet Evol* 13 (Jan): 339-43, 2013.
- 19) Khamrin P, Thongprachum A, Shimizu H, Okitsu S, Mizuguchi M, Hayakawa S, Maneekarn N, Ushijima H. Detection of human bocavirus 1 and 2 from children with acute gastroenteritis in Japan. *J Med Virol* 84 (6): 901-5, 2012.
- 20) Kitamoto N, Oka T, Katayama K, Li TC, Takeda N, Kato Y, Miyoshi T, Tanaka T. Novel monoclonal antibodies broadly reactive to human recombinant sapovirus-like particles. *Microbiol Immunol*. 2012 56 (11):760-770.
- 21) Kitaura K, Fujii Y, Matsutani T, Shirai K, Suzuki S, Takasaki T, Shimada S, Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S, Katoh H, Ogasawara K, Kurane I, Suzuki R: A new method for quantitative analysis of the T cell receptor V region repertoires in healthy common marmosets by microplate hybridization assay. *J Imm Method* 2012, 384:81-91
- 22) Kobayashi F, Yamada S, Taguwa S, Kataoka C, Naito S, Hama Y, Tani H, Matsuura Y, Sugahara K. Specific interaction of the envelope glycoproteins E1 and E2 with liver heparan sulfate involved in the tissue tropism interaction by hepatitis C virus. *Glycoconj J* 29(4): 211-20, 2012.
- 23) Koma T, Yoshimatsu K, Yasuda SP, Li TC, Amada T, Shimizu K, Isozumi R, Mai LT, Hoa NT, Nguyen V, Yamashiro T, Hasebe F, Arikawa J. A survey of rodent-borne pathogens carried by wild *Rattus* spp. in Northern Vietnam. *Epidemiology and Infection*. 2012 1:1-9.
- 24) Kubota T, Kumagai A, Ito H, Furukawa S, Someya Y, Takeda N, Ishii K, Wakita T, Narimatsu H,

- Shirato H. Structural basis for the recognition of Lewis antigens by genogroup I norovirus. *J Virol.* 2012 86(20):11138-50.
- 25) Kuroki M, Ariumi Y, Hijikata M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Shimotohno K, Kato N. PML tumor suppressor protein is required for HCV production. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 430(2):592-7.
- 26) Law JL, Chen C, Wong J, Hockman D, Santer DM, Frey SE, Belshe RB, Wakita T, Bukh J, Jones CT, Rice CM, Abrignani S, Tyrrell DL, Houghton M. A Hepatitis C Virus (HCV) Vaccine Comprising Envelope Glycoproteins gpE1/gpE2 Derived from a Single Isolate Elicits Broad Cross-Genotype Neutralizing Antibodies in Humans. *PLoS One.* 2013;8(3):e59776.
- 27) Li TC, Ami Y, Suzaki Y, Yasuda S, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takeda N, and Wakita T. Full-Genome Characterization of a Rat Hepatitis E Virus Strain Isolated in Vietnam. *EID.* 2013 19(1):115-8.
- 28) Li TC, Yoshizaki S, Ami Y, Suzaki Y, Yasuda SP, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takeda N, Wakita T. Susceptibility of laboratory rats against genotypes 1, 3, 4, and rat hepatitis E viruses. *Vet Microbiol.* 2013, 163:54-61.
- 29) Li Y, Yoshida H, Wang L, Tao Z, Wang H, Lin X, Xu A. An optimized method for elution of enteroviral RNA from a cellulose-based substrate. *J Virol Methods* 186 (1-2) : 62-7, 2012.
- 30) Liu HM, Aizaki H, Machida K, Ou JH, Lai MM. Hepatitis C virus translation preferentially depends on active RNA replication. *PLoS One.* 7:e43600, 2012.
- 31) Matsuhira T, Kaji C, Murakami S, Maebashi K, Oka T, Takeda N, Katayama K. Evaluation of four antiseptics using a novel murine norovirus. *Exp Anim.* vol. 61, 35-40, 2012.
- 32) Oka T, Mori K, Iritani N, Harada S, Ueki Y, Iizuka S, Mise K, Murakami K, Wakita T, Katayama K. Human sapovirus classification based on complete capsid nucleotide sequences. *Arch Virol,* vol157, 349-52, 2012.
- 33) Matsumura T, Kato T, Sugiyama N, Tasaka-Fujita M, Murayama A, Masaki T, Wakita T and Imawari M. 25-hydroxyvitamin D(3) suppresses hepatitis C virus. *Hepatology,* 56 (4): 1231-9, 2012.
- 34) Miyamoto S, Inoue H, Nakamura T, Yamada M, Sakamoto C, Urata Y, Okazaki T, Marumoto T, Takahashi A, Takayama K, Nakanishi Y, Shimizu H Tani K. Coxsackievirus B3 is an oncolytic virus with immunostimulatory properties that is active against lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 72 (10): 2609-21, 2012.
- 35) Miki M, Katayama K. *In silico* 3D structure analysis accelerates the solution of a real viral structure and antibodies docking mechanism. *Frontiers in Microbiology* 3: Article 387, 1-6, 2012
- 36) Murakami Y, Fukasawa M, Kaneko Y, Suzuki T, Wakita T, Fukazawa H. Selective estrogen receptor modulators inhibit hepatitis C virus infection at multiple steps of the virus life cycle. *Microbes Infect.* 2013 15(1):45-55.
- 37) Murayama A, Sugiyama N, Watashi K, Masaki T, Suzuki R, Aizaki H, Mizuochi T, Wakita T and Kato T. Japanese reference panel of blood specimens for evaluation of hepatitis C virus RNA and core antigen quantitative assays. *J Clin Microbiol,* 50 (6): 1943-9, 2012.
- 38) Murayama A, Sugiyama N, Yoshimura S, Ishihara-Sugano M, Masaki T, Kim S, Wakita

- T, Mishiro S and Kato T. A subclone of HuH-7 with enhanced intracellular hepatitis C virus production and evasion of virus related-cell cycle arrest. *PLoS ONE*. 7 (12): e52697, 2012.
- 39) Nakajima N, Kitamori Y, Ohnaka S, Mitoma Y, Mizuta K, Wakita T, Shimizu H, Arita M. Development of a Transcription-Reverse Transcription Concerted Reaction Method for Specific Detection of Human Enterovirus 71 from Clinical Specimens. *J Clin Microbiol* 50(5): 1764-8, 2012.
- 40) Nakamura T, Ichinose H, Wariishi H. Flavin-containing monooxygenases from *Phanerochaete chrysosporium* responsible for fungal metabolism of phenolic compounds. *Biodegradation* 23 (3): 343-50, 2012.
- 41) Rau SJ, Hildt E, Himmelsbach K, Thimme R, Wakita T, Blum HE, Fischer R. CD40inhibits replication of hepatitis C virus in primary human hepatocytes by c-Jun N terminal kinase activation independent from the interferon pathway. *Hepatology*. 2013 57(1):23-36.
- 42) Saeed M, Gondeau C, Hmwe S, Yokokawa H, Date T, Suzuki T, Kato T, Maurel P and Wakita T. Replication of Hepatitis C Virus Genotype 3a in Cultured Cells. *Gastroenterology*, 144 (1): 56-8, 2012.
- 43) Sekiguchi S, Kimura K, Chiyo T, Ohtsuki T, Tobita Y, Tokunaga Y, Yasui F, Tsukiyama-Kohara K, Wakita T, Tanaka T, Miyasaka M, Mizuno K, Hayashi Y, Hishima T, Matsushima K, Kohara M. Immunization with a recombinant vaccinia virus that encodes nonstructural proteins of the hepatitis C virus suppresses viral protein levels in mouse liver. *PLoS One*. 2012;7(12):e51656.
- 44) Sharp TM, SE Crawford, NJ Ajami, F Neill, RL Atmar, K Katayama, B Utama, MK Estes. Secretory pathway antagonism by calicivirus homologues of Norwalk virus nonstructural protein p22 is restricted to noroviruses. *Virology Journal* 2012, 9:181
- 45) Suzuki R, Saito K, Kato T, Shirakura M, Akazawa D, Ishii K, Aizaki H, Kanegae Y, Matsuura Y, Saito I, Wakita T, Suzuki T. Trans-complemented hepatitis C virus particles as a versatile tool for study of virus assembly and infection. *Virology*. 2012 432(1):29-38.
- 46) Takeda M, Ikeda M, Ariumi Y, Wakita T, Kato N. Development of hepatitis C virus production reporter-assay systems using two different hepatoma cell lines. *J Gen Virol*. 2012 93(Pt 7):1422-31.
- 47) Tao Z, Song Y, Wang H, Zhang Y, Yoshida H, Ji S, Xu A, Song L, Liu Y, Cui N, Ji F, Li Y, Chen P, Xu W. Intercity Spread of Echovirus 6 in Shandong Province, China: Application of Environmental Surveillance in Tracing Circulating Enteroviruses. *Appl Environ Microbiol* 78 (19): 6946-53, 2012.
- 48) Tominaga A, Kanda T, Akiike T, Komoda H, Ito K, Abe A, Aruga A, Kaneda S, Saito M, Kiyohara T, Wakita T, Ishii K, Yokosuka O, Sugiura N. Hepatitis A outbreak associated with a revolving sushi bar in Chiba, Japan: Application of molecular epidemiology. *Hepatol Res*. 2012 42(8):828-34.
- 49) Umeki S, Suzuki R, Ema Y, Shimojima M, Nishimura Y, Okuda M, Mizuno T. Anti-adhesive property of P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) due to steric hindrance effect. *J Cell Biochem* 114 (6): 1271-85, 2012.

- 50) Weng L, Kohara M, Wakita T, Shimotohno K, Toyoda T. Detergent-induced activation of the hepatitis C virus genotype 1b RNA polymerase. *Gene*. 2012 496(2):79-87.
- 51) Weng L, Tian X, Gao Y, Watashi K, Shimotohno K, Wakita T, Kohara M, Toyoda T. Different mechanisms of hepatitis C virus RNA polymerase activation by cyclophilin A and B in vitro. *Biochim Biophys Acta*. 2012 1820(12):1886-92.
- 52) Wong KT, Ng KY, Ong KC, Ng WF, Shankar SK, Mahadevan A, Radotra B, Su JI, Lau G, Ling AE, Chan KP, Macorelles P, Desai AS, Ravi V, Nagata N, Shimizu H, Takasaki T. Enterovirus 71 encephalomyelitis and Japanese encephalitis can be distinguished by topographic distribution of inflammation and specific intraneuronal detection of viral antigen and RNA in the central nervous system. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 38 (5): 443-53. 2012.
- 53) Yamamoto H, Suzuki J, Matsuda A, Ishida T, Ami Y, Suzaki Y, Adachi I, Wakita T, Takeda N, Li TC. Hepatitis E Outbreak in Monkey Facility, Japan. *EID* 2012, 18 (12) 2032-4.
- 54) Yokoyama M, Oka T, Kojima H, Nagano T, Okabe T, Katayama K, Wakita T, Kanda T, Sato H. Structural basis for specific recognition of substrates by sapovirus protease. *Frontiers in Microbiology* 3: Article 312, 1-10, 2012.
2. 和文発表
- 1) 相崎英樹、HCV 粒子形成に関与する脂肪滴周辺蛋白の同定と機能解析、*Liver Forum in Kyoto* 第14 回学術集会記録集、メディカルトリビューン、30-33, 2012.
- 2) 相崎英樹、C 型肝炎ウイルスの生活環、細胞、ニューサイエンス社、44:419-422, 2012.
- 3) 石井孝司 A 型肝炎/E 型肝炎ウイルス 小児科臨床 65: 1380-1390, 2012.
- 4) 石井孝司 2010 年春季の A 型肝炎の diffuse outbreak の分子疫学的解析 *消化器内科* 54: 233-238, 2012.
- 5) 石井孝司、清原知子 A 型肝炎ワクチン *BIO Clinica* 28: 25-29, 2013.
- 6) 石井孝司、脇田隆字 海外における A 型肝炎集団発生 -わが国への警鐘- *化学療法の領域* 28: 984-992, 2012.
- 7) 片山和彦 微生物学 ノロウイルス (ノーウォークウイルス) の GII.4 2012 変異株 *日本医事新報* No4637 p60-61, 2013.
- 8) 片山和彦 感染症ワクチン 最近の話題・課題 *ロタウイルス感染症とロタウイルスワクチン BIO Clinica* 臨時増刊号 Vol.28, 30-35, 2013.
- 9) 片山和彦 特集 ; ワクチン製造をめぐる規制・製造技術の最新動向、沈降精製百日せきジフテリア破傷風不活化ポリオ混合ワクチンの品質管理 *PHARM TECH JAPAN* vol.28, 39-41, 2012.
- 10) 加藤孝宣. C 型肝炎の病因と発症機序. *インフォームドコンセントのための図説シリーズ ; 肝炎ウイルス-B 型・C 型*, 60-63, 2012.
- 11) 加藤孝宣. ビタミンDの抗HCV作用. *肝臓フォーラム '12* 記録集 56-61, 2012.
- 12) 加藤孝宣, 岡本有加, 村山麻子, 政木隆博, 脇田隆字. HCV JFH-1キメラウイルスを用いたNS5A 阻害剤の株特異的抗ウイルス作用の評価. 特集 “C 型肝炎治療の新たな展開” *消化器内科* 54(4): 510-515, 2012.
- 13) 加藤孝宣, 松村卓哉, 井廻道夫. Vitamin DとC 型肝炎. 特集 “ウイルス肝炎-治療の最前線-” *Modern Physician* 33(4): 507-510, 2012.
- 14) 清水博之: ポリオウイルスの病原体管理、*JBSA Newsletter* 2: 11-14, 2012.
- 15) 染谷雄一、清水博之: ポリオウイルスワクチンの品質管理. *臨床とウイルス* 40 (5): 306-313, 2012.
- 16) 高山直秀, 清水博之, 梅本哲: 不活化ポリオワク

- チン接種件数に関する調査：2011年の調査結果。日本医学会雑誌 141 (5)：1052-1058, 2012.
- 17) 高山直秀, 崎山弘, 岡部信彦, 清水博之, 梅本哲：2011年度全国BCGワクチン, 経口生ポリオワクチン, DPT3 種混合ワクチン累積接種率調査報告。日本医学会雑誌 141 (7)：1549-1555, 2012.
- 18) 田中純子, 小山富子, 相崎英樹：C型肝炎ウイルス(HCV)による感染。日本臨床ウイルス学会、臨床とウイルス、40:28-35, 2012.
- 19) 筒井理華, 東海林彰, 古川紗耶香, 三上稔之, 沖栄真, 吉田弘：一過性の麻痺を呈した患者からのエンテロウイルス71型の検出—青森県。病原微生物検出情報 33：310-311, 2012.
- 20) 中島淳, 緒方健, 中村朋史, 須田隆一：過去10年間(平成14-23年度)における生物同定試験結果。福岡県保健環境研究所年報 39：113-114, 2012.
- 21) 中村朋史, 中島淳, 河村真紀子：福岡県内で違法飼育個体として保護されたメジロの遺伝子解析。福岡県保健環境研究所年報 39：110-112, 2012.
- 22) 中村朋史：白色腐朽菌の芳香族化合物代謝に関与する酵素群の同定および機能評価。木科学情報。19(1)：11-14, 2012.
- 23) 西村順裕：エンテロウイルス71の感染機構に関する研究(平成23年度杉浦賞論文)。ウイルス62 (1)：121-128, 2012.
- 24) 松村卓哉, 加藤孝宣, 井廻道夫。Vitamin Dとその代謝産物の抗HCV作用。特集“C型肝炎治療の新たな展開”消化器内科 54(4)：504-509, 2012.
- 25) 吉富秀亮, 石橋哲也, 中村朋史, 世良暢之：教育施設で発生したC群ロタウイルスによる集団胃腸炎事例—福岡県。病原微生物検出情報 33：271, 2012.
- 26) 李 天成 E型肝炎。化学療法の領域 増刊号 Vol.28 S-1. 93-100, 2012.
- 27) 脇田 隆字：C型肝炎ウイルス(HCV)の研究, Annual Review 消化器 94-8, 2013.
- 28) 脇田 隆字：肝炎ウイルス, 臨床と微生物 39: 585-590, 2012.
- 29) 脇田 隆字：B型肝炎ウイルスの生活環, 肝・胆・膵 65(4)：563-569, 2012.
- 30) 脇田 隆字：C型肝炎ウイルス培養系の確立と治療薬開発への応用, BIO Clinica 27(8)：728-732, 2012.
- 31) 渡士幸一：HBV培養細胞系による新規抗ウイルス化合物のスクリーニング, 肝胆膵 65: 611-617, 2012.
3. その他
- 1) 板持雅恵, 飯塚節子, 山下照夫, 中田恵子, 石橋哲也, 清水博之, 西村順裕, 吉田弘：手足口病病原体検査マニュアル(改訂版), 2012
- 2) 板持雅恵, 山下照夫, 石橋哲也, 清水博之, 西村順裕, 吉田弘：ヘルパンギーナ病原体検査マニュアル(改訂版), 2012
- 3) 板持雅恵, 世良暢之, 石橋哲也, 林志直, 山下照夫, 清水博之, 西村順裕, 吉田弘：ポリオウイルス感染症の実験室診断マニュアル(改訂版), 2012
- 4) 片山和彦食中毒予防必携 第3版 社団法人日本食品衛生協会 ノロウイルス p215-225, 2013
- 5) 片山和彦, 岡智一郎臨床検査ガイド 2013-2014 文光堂 ノロウイルス・サポウイルス p 769-771, 2013.
- 6) 清水博之：手足口病、特集「感染症動向2013」、メディカル朝日 42(1)：28-30, 2012.
- 7) 清水博之：ポリオの病態とポリオワクチン。小児科臨床 65 (11)：2281-2287, 2012.
- 8) 清水博之：不活化ポリオワクチンの導入と今後の課題。日本医事新報 4613, 70-75, 2012.
- 9) 清水博之：感染症担当者が知っておきたい不活化ポリオワクチンの最新状況。INFECTION CONTROL 21: 1, 2012.
- 10) 清水博之：不活化ポリオワクチン(IPV)と経口

- 生ポリオワクチン(OPV). 小児内科 44 (7): 1234-1237, 2012.
- 11) 清水博之: ポリオウイルスワクチン. ウイルス 62 (1): 57-66, 2012.
- 12) 清水博之: 手足口病の問題点. 小児科 53 (6): 751-758, 2012.
- 13) 清水博之: 不活化ポリオワクチン導入の現状と移行期の問題点. 愛知県小児科医会会報 95: 14-17, 2012.
- 14) 清水博之: 世界ポリオ根絶計画とポリオの疫学. バムサジャーナル 24 (3): 32-36, 2012.
- 15) 清水博之: 東アジア地域を中心とした手足口病流行の現状. 感染症 43 (2): 10-19, 2013.
- 16) 清水博之: 不活化ポリオワクチン導入の現状と今後の課題. Bio Clinica 3月臨時増刊号, 2013.
- 17) 清水博之: 不活化ポリオワクチンの現状. ファルマシア 49 (3), 211-216, 2013.
- 18) 清水博之(分担執筆): Country Progress Report on Maintaining Polio-free Status, Japan: WHO report: Aannual WHO report, 2012
- 19) 清水博之: 「ポリオ(急性灰白髄炎)」の項を担当、今日の治療と看護(改訂第3版) p920, 南江堂, 2013.
- 20) H. ブランズウェル、清水博之(監修): 根絶計画 詰めの一歩. 日経サイエンス 7月号: 98-105, 2012.
- 21) 山下照夫、中田恵子、石橋哲也、清水博之、西村順裕、吉田弘: 無菌性髄膜炎病原体検査マニュアル(改訂版), 2012
- 片山和彦 指導、監修(新聞記事)
- 1) 日経メディカル 2013年1月号 p33 「ノロウイルス変異株が猛威」
- 2) HOTERES2013年2月8日号 p57-60 「猛威をふるったノロウイルスを検証」
- 3) 徳洲新聞 2013年1月14日号 緊急特別企画 「ノロウイルス感染対策; 今冬は過去10年で2番目の高水準 感染ピークは12~1月で警戒厳重に」
- 4) 日本経済新聞 2013年1月13日号夕刊7面 「遺伝子変異、感染しやすく ノロウイルスなお警戒」
- 5) 朝日新聞 2012年11月27日号夕刊14面 「ノロウイルス流行の兆し」
- 6) 毎日新聞 2012年12月8日号夕刊1面 「ノロウイルス06年に次ぐ流行 変異型猛威」
- 7) 読売新聞 2012年12月15日号夕刊14面 「ノロウイルス患者急増 感染研 遺伝子変異流行の恐れ」
- 8) 朝日新聞 2012年12月24日 37面 「ノロウイルス 院内 6人死亡」
- 9) 朝日新聞 2013年1月12日号夕刊14面 ノロウイルス流行ピーク過ぎる インフルは患者数急増
- II. 学会発表
- 国際学会
- 1) Abe Y, Aly HH, Imamura M, Wakita T, Shimotohno K, Chayama K, Hijikata M. Thromboxane A2 synthase plays a key role in production of infectious HCV particles. Venice, Italy. 2012. 10. 5-9.
- 2) Akazawa D, Moriyama M, Yokokawa N, Watanabe N, Date T, Morikawa K, Aizaki H, Ishii K, Kato T, Nakamura N, Wakita T. Neutralizing Antibodies Induced by Cell Culture-Derived Hepatitis C Virus Was Effective Both *In Vitro* and *In Vivo*, 198th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, 2012. 10. 5-9.
- 3) Aly HH, Watashi K, Watanabe N, Kato T, Wakita T. Construction of Hepatitis C virus genotype 4a clone. Lido-Venice, Italy. 2012. 10. 5-9.
- 4) Aly HH, Shimotohno K, Wakita T, Oshiumi H, Seya T. HCV particles production from mouse hepatocytes. Lido-Venice, Italy. 2012. 10. 5-9.

- 5) Aly HH, Suzuki R, Oshiumi H, Wakita T, Seya T. Overcoming host restriction barriers for HCV infection in mouse. The 34th Infection, immunity and their control for health: Mucosal barrier, pathogen and vaccine. Sapporo, Japan. 2012. 10. 16-19.
- 6) Aly HH, Wakita T. New HCV genotype 4a genotype clone, The 10th JSH Single Topic Conference, "Hepatitis C : Best Practice Based on Science " Keio Plaza Hotel, Tokyo, Japan. 2012. 11. 21-22.
- 7) Ando T, Aizaki H, Sugiyama M, Mizokami M, Kuroda M, Wakita T. Independent evolution of multi-dominant viral genome species observed in a single HCV carrier. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Lido-Venice, Italy, 2012. 10. 5-9.
- 8) Arita M, Wakita T, Shimizu H: Valosin containing protein (VCP/p97) is required for poliovirus replication and involved in cellular protein secretion pathway in poliovirus infection. EUROPIC 2012: XVIIth Meeting, Saint Raphael, France, 2012. 6. 3-7.
- 9) Asif N, Hosomi T, Nishimura Y, Alam AA, Oka T, Zaidi S, Shimizu H. Genetic diversity and recombination in circulating Saffold viruses: Re-evaluating classification as a new species. Current Progress in Enterovirus 71 Research in the Asia-Pacific Region, Tokyo, 2012. 8. 30.
- 10) Fukasawa M, R Anai, Y shirasago, K Saito, Y Murakami, H Fukazawa, T Suzuki, T Wakita, J Chiba, K Hanada, Isolation and characterization of a mutant Hepatitis C virus adapted to mouse CD81, 198th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, 2012. 10. 5-9.
- 11) Ishii K, Kanda T, Sugiura N, Kiyohara T, Yoshizaki S, Nakamura N, Shimada T, Nakashima K, Tada Y, Yokosuka O, Wakita T. Noda M. Epidemiological and genetic analysis of hepatitis A between 2010 and 2011 in Japan. 14th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Diseases. Shanghai, China. 2012. 6. 22-25.
- 12) Ishii K. Epidemiological and genetic analysis of hepatitis A virus infection in Japan. 15th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim. Singapore. 2013. 3. 10-14.
- 13) Ito M, Suzuki R, Wakita T, Suzuki T. Permissivity of HuH-7-derived oval-like cells to HCV infection and replication. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Lido-Venice, Italy, 2012. 10. 5-9.
- 14) Ito M, Suzuki R, Wakita T, Suzuki T. Epigenetic reprogramming of HuH-7 cells shift cellular permissivity to HCV. The 10th JSH Single Topic Conference, "Hepatitis C : Best Practice Based on Science " Keio Plaza Hotel, Tokyo, Japan. 2012. 11. 21-22.
- 15) Kato T, Matsumura T, Sugiyama N, Murayama A, Wakita T, Imawari M. Anti-Hepatitis C virus effect of 25-hydroxyvitamin D3 targeting infectious virus production. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Lido-Venice, Italy. 2012. 10. 5-9.
- 16) Kim S, Date T, Aizaki H, Watanabe H, Wakita T. NS3 protease derived from genotype 1b Con1 attenuates viral replication. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Lido-Venice, Italy. 2012. 10. 5-9.

- 17) Kim S, Date T, Aizaki H, Watanabe H, Wakita T. NS3 protease derived from genotype 1b Con1 attenuates viral replication. The 10th JSH Single Topic Conference, “Hepatitis C : Best Practice Based on Science “ Keio Plaza Hotel, Tokyo, Japan 2012. 11. 21-22.
- 18) Kubota T., Kumagai A., Ito H., Furukawa S., Someya Y., Ishii K., Wakita T., Takeda N., Shirato H. and Narimatsu H. X-ray crystallographic studies on binding specificity of norovirus to Lewis antigens. 4th Asian Communications of Glycobiology and Glycotechnology. Jeju, Korea, 2012. 10.28-31.
- 19) Lee H, Cifuentes JO, Carnegie MS, Markoff A, Conway J, Shimizu H, Tano Y, Nishimura Y, Hafenstein S: The cryoEM structure of EV71 bound by fragments of neutralizing antibody predicts a mechanism of neutralization by crosslinking and competition with PSGL-1. The 17th Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses. Saint Raphaël, France, 2012. 6. 3-7.
- 20) Li T.C., Yoshimatsu K., Yasuda S., Arikawa J., Kataoka M., Ami Y., Suzaki Y., Ishii K., Takeda N. and Wakita T. Antigenicity and infectivity of rat hepatitis E virus. The 9th Japan-China International Conference of Virology. Sapporo, Japan, 2012. 6.12-13.
- 21) Li T.C., Yoshimatsu K., Yasuda S., Arikawa J., Ami Y., Suzaki Y., and Wakita T. Characterizations of the infectivity of genotype 1, 3, 4 and rat hepatitis E viruses in laboratory rats. 14th international Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease (14th ISVHLD). China Shanghai. 2012. 6.22-25.
- 22) Matsuda M, Suzuki R, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. An alternative endocytosis pathway for the infectious entry of hepatitis C virus. The 10th JSH Single Topic Conference, “Hepatitis C : Best Practice Based on Science “ Keio Plaza Hotel, Tokyo, Japan 2012. 11. 21-22.
- 23) Matsumoto Y, Watanabe N, Watashi K, Suzuki R, Matsuura T, Suzuki T, Miyamura T, Ichinose S, Wake K, Wakita T, Aizaki H. Antiviral activity of glycyrrhizin against hepatitis C virus in vitro. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, Japan. 9.11-14, 2012.
- 24) Matsumoto Y, Watanabe N, Watashi K, Suzuki R, Matsuura T, Suzuki T, Miyamura T, Wake K, Wakita T, Aizaki H. Antiviral activity of glycyrrhizin against Hepatitis C virus in vitro. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Lido-Venice, Italy, 2012. 10. 5-9.
- 25) Matsumoto Y, Matsuura T, Suzuki T, Wake K, Wakita T, Aizaki H. Antiviral activity of glycyrrhizin against Hepatitis C virus in vitro. The 10th JSH Single Topic Conference, “Hepatitis C : Best Practice Based on Science “ Keio Plaza Hotel, Tokyo, Japan 2012. 11. 21-22.
- 26) Murayama A, Kato T, Sugiyama N, Wakita T. Infectious Virus Production with Hepatitis C Virus Genotype 2b Genome Harboring Minimal Regions of JFH-1. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Lido-Venice, Italy. 2012. 10. 5-9.
- 27) Murayama A, Sugiyama N, Yoshimura S, Ishihara-Sugano M, Wakita T, Mishihiro S, Kato T. Efficient hepatitis C virus production associated with enhanced virus assembly and evasion of cell cycle arrest. 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, USA. 2012.

11. 9-13.
- 28) Muroi A, S Takahama, M Arimoto, R Morishita, T Suzuki, T Wakita, Y Endo, T Sawasaki, Comprehensive screening of host proteins cleaved by HCV protease using wheat cell-free protein synthesis system, 198th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, 2012. 10. 5-9.
- 29) Nakajima N, Kitamori Y, Ohnaka S, Mitoma Y, Mizuta K, Wakita T, Shimizu H, Arita M: Development of a Transcription-Reverse Transcription Concerted Reaction Method for Specific Detection of Human Enterovirus 71 from Clinical Specimens. Current Progress in Enterovirus 71 Research in the Asia-Pacific Region, Tokyo, Japan, 2012. 8.30-31.
- 30) Nakajima S, Watashi K. Identification of natural products inhibiting hepatitis C virus infection: The 1st International Symposium on Chemical Biology of Natural Products, Kyoto, Japan, 2012.10.31-11.1.
- 31) Shimizu H. Genetic and Phenotypic Diversity of Enterovirus 71. Current Progress in Enterovirus 71 Research in the Asia-Pacific Region, Tokyo, 2012.8.30.
- 32) Shimizu H: Hand, foot, and mouth disease and Enterovirus 71 infection. NIID-China CDC meeting on Collaborative Research meeting, Tokyo, 2012.11.21.
- 33) Shimoike T, Takagi H, Oka T, Murakami K, Todaka-Takai R, Park YB, Fujii Y, Wakita T, and Katayama K: Visualization of Murine Norovirus proteins and its genome RNA: 52nd Annual meeting of The American Society for Cell Biology, San Francisco, USA.2012. 12.15-19.
- 34) Shimura S, Ishima M, Ota I, Tsutsui E, Kamisuki S, Murata H, Yamazaki T, Suzuki T, Kuramochi K, Takeuchi T, Watashi K, Kobayashi S, Sugawara F: Synthetic studies of MA026, a novel antiviral lipocyclodepsipeptide. International Congress on Natural Products Research 2012, New York, USA, 2012.7.28-8.1.
- 35) Shiota T, Li TC, Yoshizaki S, Takeda N, Wakita T, and Ishii K: Characterization of Hepatitis E Virus Capsid C-terminal 52 Amino Acids in the Viral Life-Cycle. The 34th Naito Conference on Infection, Immunity and their Control for Health: Mucosal Barrier, Pathogen and Vaccine, Sapporo, Japan, 2012.10.16-19.
- 36) Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Identification of the signal peptidase complex subunit 1 as a novel host factor that participates in the assembly of hepatitis C virus. The 11th Awaji international forum on infection and immunity. Awaji, Japan. 9. 11-14, 2012
- 37) Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Suzuki T, Wakita T. An alternative endocytosis pathway for the productive entry of Hepatitis C virus. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Lido-Venice, Italy, 2012. 10. 5-9.
- 38) Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Identification of a host factor that interacts with hepatitis C virus NS2 protein and participates in the assembly of the virus through an interaction with E2 and NS2. The 34th Infection, immunity and their control for health: Mucosal barrier, pathogen and vaccine. Sapporo, Japan. 2012. 10. 16-19.

- 39) Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Identification of a host factor that interacts with hepatitis virus NS2 protein and participates in the viral assembly. The 10th JSH Single Topic Conference, "Hepatitis C : Best Practice Based on Science " Keio Plaza Hotel, Tokyo, Japan 2012. 11. 21-22.
- 40) Uchida N, Watashi K, Suzuki R, Aizaki H, Chiba J, Wakita T. Phospholipase D regulates membrane trafficking during Hepatitis C virus egress. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Venice, Italy 2012. 10. 5-9.
- 41) Umami RN, Hosomi T, Nishimura Y, Shimizu H: Genetic analysis of PSGL-1-tropic enterovirus 71 isolates from clinical samples. The 17th Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses. Saint Raphaël, France, 2012. 6. 3-7.
- 42) Wakita T. Hepatitis C Virus Replication Models and Anti-viral Development. The 25th International Conference on Antiviral Research (ICAR) Sapporo, Japan. 2012. 4. 16-19.
- 43) Wakita T. Basic concepts of Hepatitis C, 1st Asian Conference on Hepatitis B and C, HIV and Influenza, Beijing Marriott Hotel City Wall, Beijing, China. 2012. 5. 18-19.
- 44) Wakita T. Production of cell culture adapted HCV strain, International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Cancer, Peking University Center for Infectious Diseases Research, Beijing, China. 2012. 6. 21.
- 45) Wakita T, T Date, S Kim, T Kato, Novel Cell Culture-Adapted Hepatitis C Virus Infectious Clone, 198th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, 2012. 10. 5-9.
- 46) Wakita T. Independent Evolution of Multi-dominant Viral Genome Species of Hepatitis C Virus, The 10th JSH Single Topic Conference, "Hepatitis C : Best Practice Based on Science " Keio Plaza Hotel, Tokyo, Japan 2012. 11. 21-22.
- 47) Watanabe N, Date T, Aly HH, Aizaki H, Wakita T. Neutralization antibody induction by immunization with E2 proteins purified from different cells. Lido-Venice, Italy. 2012. 10. 5-9.
- 48) Watanabe N, Date T, Aizaki H, Wakita T. The role of envelope N-glycans in HCV lifecycle. The 10th JSH Single Topic Conference, "Hepatitis C : Best Practice Based on Science " Keio Plaza Hotel, Tokyo, Japan 2012. 11. 21-22.
- 49) Watashi K, Uchida N, Daito T, Kiyohara T, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T: Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha suppressed hepatitis B virus infection through NF-kappaB signaling pathway. 2012 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B viruses, Oxford, England, 2012. 9. 22-25.
- 50) Watashi K, Uchida N, Saeed M, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T. Characterization of anti-HCV release inhibitors targeting phospholipase D. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Lido-Venice, Italy, 2012. 10. 5-9.
- 51) Watashi K, Uchida N, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T. Phospholipase D is a cellular regulator during hepatitis C virus egress and a possible target for antiviral strategy. The 10th JSH Single Topic Conference, "Hepatitis

C : Best Practice Based on Science “ Keio Plaza Hotel, Tokyo, Japan 2012. 11. 21-22.

2. 国内学会

- 1) 青野光子, 三輪誠, 岡崎淳, 武田麻由子, 小松宏昭, 山神真紀子, 中島寛則, 岡村祐里子, 須田隆一, 中村朋史, 古川誠, 柳沼圭吾, 渡邊稔, 横山仁, 久保明弘, 佐治光: 遺伝子発現による植物のストレス診断はどこまで出来るか?. 第53回大気環境学会年会, 横浜, 2012. 9. 12-14.
- 2) 阿部雄一, アリ・ハッサン・フセイン, 今村道雄, 脇田隆字, 下遠野邦忠, 茶山一彰, 土方誠: C型肝炎ウイルス(HCV)の感染性粒子形成において重要な宿主因子、トロンボキサン A2(TXA2)合成酵素の同定と機能解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012. 11. 13-15.
- 3) Aly HH, Kunitada Shimotohno, Hiroyuki Oshiumi, Takaji Wakita, and Tsukasa Seya. HCV particles production from mouse hepatocytes. 第34回内藤カンファレンス、札幌、2012. 10. 16-19.
- 4) アリ・ハッサン・フセイン, 加藤孝宣, 渡邊則幸, 田中靖人, 溝上雅史, 脇田隆字. Cloning of HCV4a full length genome (EJ1) from a chronic HCV carrier. 第60回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012. 11. 13-15.
- 5) 有田峰太郎: Valosin containing protein (VCP/p97) is required for poliovirus replication and involved in cellular protein secretion pathway in poliovirus infection. 第34回内藤カンファレンス、札幌、2012. 10. 16-19.
- 6) 有田峰太郎: 抗エンテロウイルス化合物群の探索とそのウイルス感染阻害機構の解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012. 11. 13-16.
- 7) 有田峰太郎, 脇田隆字, 清水博之: VCP/p97 はポリオウイルスの複製に必要とされる新規宿主因子であり、ウイルス感染における細胞タンパク質分泌経路に關与する. 第60回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012. 11. 13-16.
- 8) 安東友美, 相崎英樹, 杉山真也, 溝上雅史, 黒田誠, 脇田隆字: C型肝炎ウイルスの quasispecies 解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012. 11. 13-16.
- 9) 石田雄二, 柳愛美, 吉美康美, 山崎ちひろ, 横道博, 渡士幸一, 脇田隆字, 茶山一彰, 立野知世. ヒト肝細胞キメラマウス由来の初代培養ヒト肝細胞へのHBV感染、第48回日本肝臓学会総会、ホテル日航金沢、2012. 6. 7-8.
- 10) 石橋哲也, 吉富秀亮, 前田詠里子, 中村朋史, 前田詠里子, 世良暢之, 千々和勝巳: 福岡県におけるA群ロタウイルス遺伝子解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012. 11. 13-15.
- 11) 伊藤昌彦, 鈴木亮介, 福原崇介, 松浦善治, 脇田隆字, 鈴木哲朗: HuH-7由来オーバル様細胞におけるHCV感受性の解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012. 11. 13-15.
- 12) 林昌宏, 網康至, 藤井克樹, 北浦一孝, モイメンリン, 白井顕治, 小滝徹, 須崎百合子, 森川茂, 西條政幸, 鈴木隆二, 倉根一郎, 高崎智彦: マーモセットを用いたチクングニアウイルスの霊長類モデルの検討 第60回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012. 11. 13-15.
- 13) 小倉大直, 君塚圭亮, 杉山隆一, 日紫喜隆行, 下遠野邦忠, 高久洋. C型肝炎ウイルス(HCV)複製制御に係る宿主因子 Hsp70 の機能解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012. 11. 13-15.
- 14) 川西 祐一, Raj Gurung, 山田 明德, 片岡 周子, 伴戸 久徳, 松浦 善治, 中島 裕美子, 前川 秀彰: バキュロウイルスをベクターに用いたDNAトランスポゾンの水平伝播機構解明に向けたモデル実験系の構築. 第35回日本分子生物学会年会, 福岡, 2012. 12. 11-14.

- 15) 清原知子、脇田隆字、石井孝司：B型肝炎ワクチン力価測定法の比較：第16回日本ワクチン学会，横浜，2012，11.17-18
- 16) 清原知子、Niroshana Dahanayaka、脇田隆字、石井孝司：スリランカにおけるA型肝炎の流行（2009-2010年）、第16回日本渡航医学会、大阪，2012.7.21-22.
- 17) 久保田智巳、熊谷安希子、伊藤浩美、古川早苗、染谷雄一、石井孝司、脇田隆字、武田直和、成松久、白土東子「X線結晶学によるノロウイルスのウイルス抗原結合特異性解析」第31回日本糖質学会年会、鹿児島，2012.9.17-20.
- 18) 小谷治、鈴木忠樹、Naeem Asif、岩田奈織子、中島典子、片野晴隆、田口文広、長谷川秀樹、清水博之、永田典代：新生仔マウスにおける新規ヒトカルジオウイルス(Saffold virus)の神経病原性の解析。第60回日本ウイルス学会学術集会，大阪，2012.11.13-15.
- 19) 坂田幸太郎、原詳子、鈴木哲郎、相崎英樹、脇田隆字、小嶋聡一、C型肝炎ウイルスNS3プロテアーゼによるTGF- β 疑似活性の発現、第48回日本肝臓学会総会、ホテル日航金沢、2012.6.7-8.
- 20) 塩田智之、李天成、吉崎佐矢香、武田直和、脇田隆字、石井孝司：E型肝炎ウイルス生活環におけるカプシド蛋白C末端52アミノ酸の機能解析。第60回日本ウイルス学会学術集会，大阪，2012.11.13-15.
- 21) 清水博之：不活化ポリオワクチン導入-日本の課題・世界の課題。第59回日本小児保健協会学術集会、岡山市、2012.9.28.
- 22) 清水博之：WHOポリオ実験室ネットワークにおけるバイオセーフティ教育訓練。第12回日本バイオセーフティ学会学術集会。東京、2012.11.7.
- 23) 清水博之：不活化ポリオワクチン導入とポリオワクチンの将来。第60回日本ウイルス学会学術集会，大阪，2012.11.13-15.
- 24) 清水博之：ポリオ根絶計画とポリオワクチンの将来。第16回日本ワクチン学会，横浜，2012，11.17-18.
- 25) 清水博之：ポリオワクチン。シンポジウム「ウイルス感染症とワクチン」。第28回日本環境感染学会総会。横浜市，2013.3.1.
- 26) 清水博之：世界ポリオ根絶計画と不活化ポリオワクチン。長崎ウイルス感染症フォーラム。大村市，2013.3.26
- 27) 清水博之：エンテロウイルス感染症の現状と問題点。長崎ウイルス感染症フォーラム。大村市，2013.3.26
- 28) 下池貴志、高木弘隆、岡智一郎、村上耕介、戸高玲子、朴英斌、藤井克樹、脇田隆字、片山和彦：マウスノロウイルス感染細胞内のウイルス蛋白質とそのゲノムRNAの局在。第60回日本ウイルス学会学術集会，大阪，2012.11.13-15.
- 29) 下池貴志、野島清子、脇田隆字、岡田義昭、血液製剤におけるC型肝炎ウイルスの不活化の検討。第60回日本ウイルス学会学術集会，大阪，2012.11.13-15.
- 30) 白砂圭崇、齊藤恭子、村上裕子、深澤秀輔、鈴木哲朗、脇田隆字、花田賢太郎、千葉丈、安部良、深澤征義、高感染能を有するHCV JFH-1適応変異株の性状解析。第60回日本ウイルス学会学術集会，大阪，2012.11.13-15.
- 31) 杉山隆一、西辻裕紀、長沼晴樹、脇田隆字、高久洋。HIV-1 NefはHSP70を介したTat活性化を抑制する。第60回日本ウイルス学会学術集会，大阪，2012.11.13-15.
- 32) 杉山隆一、西辻裕紀、村上優子、武内寛明、脇田隆字、高久洋。HSP70誘導剤：Prostaglandin A₁はHIV-1 VifによるAPOBEC3G分解を抑制することでHIV-1複製を阻害する。第26回日本エイズ学会学術集会，横浜，2012.11.24-26.
- 33) 染谷雄一、守口匡子、白土東子、武田直和、奥野良信、黒澤良和、谷口孝喜：ヒト型抗ノロウイルス抗体のウイルス-血液型抗原吸着阻害活性の検討。日本薬学会第133年会，2013.3.27-30.
- 34) 高木弘隆、藤井克樹、村上耕介、戸高玲子、下

- 池貴志、小林宣道、片山和彦：A群ロタウイルス（RVA）の分離・増殖における感受性細胞株のクローニングによる検討。第60回日本ウイルス学会学術集会，大阪，2012.11.13-15.
- 35) 田中聖一、山本 博、万年和明、李 天成。ニホンザルにおける E 型肝炎ウイルス感染状況。第 60 回日本ウイルス学会学術集会，大阪，2012.11.13-15.
- 36) 戸高玲子、村上耕介、岡智一郎、高木弘隆、朴英斌、下池貴志、藤井克樹、脇田隆宇、中西章、片山和彦：カリシウイルスのユニバーサルなプラスミドベアスリバースジェネティックシステム。第60回日本ウイルス学会学術集会，大阪，2012.11.13-15.
- 37) Todaka R, T Oka, K Murakami, T Shimoike, Y Fujii, YB Park, H Takagi, T Wakita, A Nakanishi, K Katayama : Development of plasmid DNA transfection-based reverse genetics system for murine norovirus and feline calicivirus 第35回日本分子生物学会年会，福岡，2012.12.11-14.
- 38) 中井 正人, Hussein H Aly, 松本 美佐子, 坂本直哉, 瀬谷 司. B細胞におけるHCV感染・複製. 第60回日本ウイルス学会学術集会，大阪，2012.11.13-15.
- 39) 中島淳, 小早川みどり, 中村朋史, 高久宏佑, 鹿野雄一, 乾隆帝, 大石敏, 鬼倉徳雄: ヒナモロコの系統地理と福岡県における保全方針の提案. 第45回日本魚類学会年会，山口，2012.9.21-24.
- 40) 中村朋史, 吉富秀亮, 石橋哲也, 前田詠里子, 世良暢之: 下水流入水からのエンテロウイルス分離. 第60回日本ウイルス学会学術集会，大阪，2012.11.13-15.
- 41) Park YB, R Todaka, T Shimoike, K Murakami, Y Fujii, T Wakita, K Katayama : Evaluation of two newly developed human norovirus detection system direct RT-PCR and BLEIA 第35回日本分子生物学会年会，福岡，2012.12.11-14.
- 42) 原田誠也、西村浩一、李 天成、石井孝司、田中智之、野田 衛：熊本県におけるイノシシ、シカ及びブタの E 型肝炎ウイルス汚染実態調査と分子疫学的解析。第60回日本ウイルス学会学術集会，大阪，2012.11.13-15.
- 43) 藤井克樹：ロタウイルスゲノム解析と分子疫学 衛生微生物技術協議会第33回研究会，横浜，2012.6.28-29.
- 44) 藤井克樹：ロタウイルスの新知見 ウイルス性下痢症研究会第24回学術集会，大阪，2012.11.12.
- 45) 藤井克樹、下池貴志、高木弘隆、Dennis Francis、村上耕介、朴英斌、戸高玲子、脇田隆宇、片山和彦：RT-PCRによるA群ロタウイルスの全11セグメントの増幅法の構築。第60回日本ウイルス学会学術集会，大阪，2012.11.13-15.
- 46) 藤田めぐみ, 脇田隆宇, 加藤孝宣: HCV genotype 1b株キメラウイルスを用いたHCV core領域アミノ酸70/91変異株の解析. ワークショップ18:C型肝炎ウイルスの制御を目指した基礎戦略, 第48回日本肝臓学会総会, 金沢, 2012.6.7-8.
- 47) 町田早苗、清水博之：小児無菌性髄膜炎患者から検出されたエンテロウイルスの分子疫学的解析。第60回日本ウイルス学会学術集会，大阪，2012.11.13-15.
- 48) 松田麻未、鈴木亮介、渡士幸一、相崎英樹、松浦善治、鈴木哲朗、脇田隆宇：C型肝炎ウイルスの一過性感染性粒子を用いた細胞内侵入機構の解析。第60回日本ウイルス学会学術集会，大阪，2012.11.13-15.
- 49) 松本喜弘, 渡邊則幸, 渡士幸一, 鈴木亮介, 松浦知和, 鈴木哲朗, 宮村達男, 和氣健二郎, 脇田隆宇, 相崎英樹, グリチルリチンのC型肝炎ウイルスに対する抗ウイルス作用の解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会，大阪，2012.11.13-15.
- 50) 宮本将平、井上博之、王 倍倍、安成啓佑、坂本千香、成澤 慈、中村貴史、山田明子、浦田泰生、

- 高山浩一、中西洋一、清水博之、谷憲三朗：非小細胞肺癌に対する免疫刺激性腫瘍溶解性コクサッキーウイルス B3 型. 日本癌学会学術総会、2012. 9. 19-9. 21.
- 51) 村上耕介、岡智一郎、下池貴志、藤井克樹、朴英斌、戸高玲子、脇田隆字、松田幹、片山和彦：ノロウイルス VLP の Caco-2 細胞への結合に関与するタンパク質の探索. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012. 11. 13-15.
- 52) Murakami K, T Oka, T Shimoike, Y Fujii, YB Park, R Todaka, T Wakita, T Matsuda, K Katayama : Screening for candidate receptor on Caco-2 involved in norovirus binding by mass spectrometry from different approaches 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡, 2012. 12. 11-14.
- 53) 村山麻子、三代俊治、脇田隆字、加藤孝宣. C 型肝炎ウイルス産生効率の良い HuH-7 細胞サブクローンの同定と解析. 第 19 回肝細胞研究会. 札幌. 2012. 6. 29-30.
- 54) 村山麻子、加藤孝宣、杉山奈央、脇田隆字. C 型肝炎ウイルス遺伝子型 2b 株と JFH-1 株のキメラウイルスを用いた抗ウイルス薬評価系の樹立. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012. 11. 13-15.
- 55) 村山麻子、杉山奈央、岡本有加、政木隆博、脇田隆字、加藤孝宣. NS5A 領域置換 HCV キメラ株を用いた NS5A 阻害剤の株特異的抗ウイルス活性の評価. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡. 2012. 12. 11-14.
- 56) 守口匡子、白土東子、染谷雄一、武田直和、奥野良信、黒澤良和、谷口孝喜：フェージディスプレイ法により単離したヒト型抗ノロウイルス抗体の、ウイルス-血液型抗原吸着阻害活性の検討. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012. 11. 13-15.
- 57) 横川寛、森山正樹、赤澤大輔、中村紀子、石井孝司、加藤孝宣、脇田隆字：イオン交換クロマトグラフィーを用いた C 型肝炎ウイルス粒子精製の検討. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012. 11. 13-15.
- 58) 横川寛、森山正樹、赤澤大輔、中村紀子、石井孝司、加藤孝宣、脇田隆字：イオン交換クロマトグラフィーを用いた C 型肝炎ウイルス粒子精製の検討. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡. 2012. 12. 11-14.
- 59) 吉富秀亮、前田詠里子、中村朋史、石橋哲也、前田詠里子、世良暢之、松田健太郎：乳幼児の遷延喘鳴に関与する呼吸器ウイルス. 第60回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012. 11. 13-15.
- 60) 李 天成、片岡紀代、網 康至、須崎百合子、安田俊平、吉松組子、有川二郎、武田直和、脇田隆字. ラット E 型肝炎ウイルス様粒子の作製および粒子形成に必須な領域の同定. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012. 11. 13-15.
- 61) 渡士幸一：数理モデルを用いた肝炎ウイルスの解析. 第 22 回数理生物学会, 岡山, 2012. 9. 10-12.
- 62) 渡士幸一、内田奈々子、大東卓史、清原知子、鈴木亮介、相崎英樹、脇田隆字, IL-1 および TNF-alpha の B 型肝炎ウイルス感染阻害効果. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012. 11. 13-15.
- 63) 渡邊則幸、伊達朋子、Aly Hussein、相崎英樹、脇田隆字：異なる細胞を用いて作成した E2 タンパク質の中和抗体誘導効果. 第60回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012. 11. 13-15.
- III. その他
- 1) 相崎英樹、HCV 感染に伴う宿主の代謝の変化-脂質代謝、エネルギー代謝を中心に-、The 11th Hepatitis Expert Meeting・学術講演会・教育講演、東京、2012. 8.
- 2) 相崎英樹、HCV 粒子形成に関与する脂肪滴周辺蛋白の同定と機能解析、Liver Forum in Kyoto 第14 回学術集会、京都、2012. 4.

ウイルス第二部

- 3) 相崎英樹、HCV粒子形成に關与する宿主因子の同定と解析、平成24年度遺伝子病制御研究所研究集会、感染・免疫・炎症・発癌、北海道、2012. 6.
- 4) 有田峰太郎：ポリオ根絶を目指す近年のポリオウイルス研究と治療の可能性について。日本ポリオの会、東京、2012. 7. 14.
- 5) 加藤孝宣。ビタミンDによる抗HCV効果。第25回肝臓フォーラム。東京。2012. 6. 30.
- 6) 加藤孝宣.C型肝炎ウイルス感染増殖系とその応用。第14回仙台リバーミーティング。仙台。2012. 7. 7.
- 7) 清水博之：新しいポリオワクチン；不活化ポリオワクチン導入と移行期の問題点。第3回北里感染症教育フォーラム、東京、2012. 5. 12.
- 8) 清水博之：ポリオ対策の現状と課題-日本における不活化ポリオワクチン導入の現状と問題点-中華人民共和国「国家級公衆衛生政策計画管理プロジェクト」EPIセミナー、北京、2012. 8. 16.
- 9) 清水博之：不活化ポリオワクチンの導入と課題。東大和市立保健センター、東大和市、2012. 8. 27.
- 10) 清水博之：不活化ポリオワクチンと移行期の課題。相模原市小児科医会講演会、相模原市、2012. 9. 19.
- 11) 清水博之：世界のポリオ根絶とポリオワクチン。理化学研究所 横浜研究所一般公開セミナー、横浜市、2012. 9. 29.
- 12) 清水博之：不活化ポリオワクチンの導入と今後の課題。平成24年度感染症機器管理研修会。東京、2012. 10. 17.
- 13) 渡士幸一：低分子化合物を利用した肝炎ウイルス学解析。東京大学医科学研究所第一回感染症国際研究センターシンポジウム、東京、2012. 3.
- 14) 渡士幸一：抗HBV剤探索とHBV感染増殖機構の解析。LIVER2012 第8回肝免疫・ウイルス・フロンティア肝疾患研究の新潮流、東京、2012. 4.
- 4) 片山和彦：日本テレビ Oha!4NEWS LIVE, 2012. 12. 14.
- 5) 片山和彦：テレビ朝日 モーニングバード！, 2012. 12. 21.
- 6) 片山和彦：NHK 情報 LIVE ただいま！, 2012. 12. 21.
- 7) 片山和彦：日本テレビ NEWS ZERO, 2012. 12. 24.
- 8) 片山和彦：日本テレビ Oha!4NEWS LIVE, 2012. 12. 25.

(ラジオ番組) 出演

- 1) 片山和彦：NHK ラジオ 私も一言 「ここに注目 感染性胃腸炎を起こすノロウイルスの正体」, 2013. 2. 1.

(テレビ放送) 出演、指導、監修

- 1) 片山和彦：日本テレビ；バンキシャ！, 2012. 12. 2.
- 2) 片山和彦：TBS；ひるおび！, 2012. 12. 4.
- 3) 片山和彦：日本テレビ news every, 2012. 12. 13.